

**STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE
VORAUSSETZUNGEN
FÜR DIE SEQUENZSPEZIFISCHE
BINDUNG DES SV40 T-ANTIGENS
AN DAS VIRALE GENOM**

Evangelia Vakalopoulou



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0057

*STRUKTURELLE UND FUNKTIONELLE VORAUSSETZUNGEN
FÜR DIE SEQUENZSPEZIFISCHE BINDUNG
DES SV40 T-ANTIGENS AN DAS VIRALE GENOM*

*Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität, München*

*vorgelegt
von
Evangelia Vakalopoulou*

*am
15. Mai 1986*

1. Berichterstatter: Frau Prof. Dr. E. Fanning
2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 26.6.86

Στή Θεία Ματίνα

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. EINLEITUNG	1
<i>Das Simian Virus 40</i>	1
<i>Das große Tumor-Antigen</i>	3
<i>Interaktionen zwischen T-Antigen und DNA</i>	5
<i>Aufgabenstellung</i>	6
II. MATERIAL	7
<i>Zellen und Virus</i>	7
<i>Bakterienstämme</i>	7
<i>Plasmide</i>	8
<i>Seren und Medien</i>	9
<i>Enzyme</i>	9
<i>Chemikalien und andere Materialien</i>	10
III. METHODEN	12
<u><i>Zelllinien - Virus</i></u>	12
<i>Virusvermehrung</i>	12
<i>Zellextraktpräparation</i>	13
<i>Dichtegradienten Zentrifugation der Zellextrakte</i>	13
<u><i>Enzymatische Reaktionen mit DNA</i></u>	14
<i>Reinigung und Konzentrierung der DNA</i>	14
<i>Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	15
<i>Dephosphorylierung</i>	15
<i>Markieren von 5'-Enden mit Polynukleotidkinase</i>	16
<i>Markieren von 3'-Enden mit Klenow Polymerase</i>	16
<i>Ligase</i>	16
<u><i>Charakterisierung der DNA</i></u>	17
<i>Auftrennung auf Agarose Gelen</i>	17
<i>Isolierung von DNA aus Agarose Gelen</i>	17
<i>Auftrennung auf Polyacrylamidgele</i>	18
<i>DNA-Sequenzierung</i>	19

	Seite
<u>Bakterienzucht</u>	20
Vermehrung von Bakterien auf Agarplatten	20
Vermehrung von Bakterien in Flüssigkultur	20
Herstellen von transformations-kompetenten Bakterien	21
Aufbewahrung	21
<u>Identifizierung rekombinanter Plasmide</u>	22
Einzelkolonie Gelelektrophorese	22
Schnellmethode zur Isolierung von Plasmid DNA durch alkalischen Aufschluß	22
Isolierung von Plasmiden über Dichtegradienten-zentrifugation	23
<u>DNA-Protein Bindungsexperimente</u>	23
Präparation von Staphylococcus	23
Reinigung von monoklonalen Antikörpern	24
Messung der Radioaktivität in Gelstückchen	24
Modifizierter DNA Bindungstest	24
Footprint-Analyse	26
Gel Retention Assay	26
<u>Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese</u>	27
Einzelstrang Isolierung	27
Oligonukleotid Reiniging	28
Oligonukleotid Phosphorylierung	29
Oligonukleotid Annealing und Auffüllen	29
Koloniehybridisierung	30
 IV. ERGEBNISSE	 31
<u>Konstruktion einer Bindungsstelle mit hoher Affinität für das T-Antigen</u>	31
Charakterisierung von pONwt	31
Bindungsverhalten von pONwt	33
 <u>Modifizierung der Footprint Analyse mit rohen Proteinextrakten</u>	 35

	Seite
<u>Konstruktion von Plasmiden mit Mutationen in Bindungsstelle I</u>	39
Footprint Analyse der T-Antigen Bindung an der mutierten Bindungsstelle I	42
<u>Konstruktion einer Mutante mit 1 bp-Deletion in der Spacer Region von Bindungsstelle I</u>	45
Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese	46
Bindung von T-Antigen an pONdlSPAa	47
<u>Ausarbeitung des Gel Retention Assays für T-Antigen Bindung an Bindungsstelle I</u>	50
<u>Affinitätsbestimmung des T-Antigens für pONwt und Mutanten der Bindungsstelle I</u>	55
<u>Plasmide mit mehreren Kopien der mutierten Bindungsstelle I</u>	58
Charakterisierung	58
Bindung von T-Antigen an pONdlSPA 3 und pONsubPEN 2	58
<u>Bindung des T-Antigens an die DNA SV40-verwandter Viren</u>	64
Bindung des T-Antigens an Polyoma Sequenzen	64
Bindung des SV40-T-Antigens an BK- JC- und LPV Viren	70
<u>Charakterisierung der Bindung von oligomeren Formen von T-Antigen an virale DNA</u>	74
Bindungsaktivität der oligomeren T-Antigen Formen	74
<u>DNA-Bindung mit mutierten T-Antigenen aus transformierten Zelllinien</u>	83

	<i>Seite</i>
<i>V. DISKUSSION</i>	<i>91</i>
<i>VI. ZUSAMMENFASSUNG</i>	<i>103</i>
<i>VII. LITERATURVERZEICHNIS</i>	<i>104</i>

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

<i>Abb.</i>	<i>Abbildung</i>
<i>Ad5</i>	<i>Adenovirus Typ 5</i>
<i>bp</i>	<i>Basenpaar</i>
<i>°C</i>	<i>Grad Celsius</i>
<i>Ci</i>	<i>Curie</i>
<i>cpm</i>	<i>gezählte Zerfälle pro Minute</i>
<i>ddNTP</i>	<i>2',3'-Didesoxyribonukleosid-triphosphat</i>
<i>g/l</i>	<i>Gramm pro Liter</i>
<i>h</i>	<i>Stunden</i>
<i>IgG</i>	<i>Immunglobulin G</i>
<i>kd</i>	<i>Kilodalton</i>
<i>mg</i>	<i>Milligramm</i>
<i>min</i>	<i>Minuten</i>
<i>ml</i>	<i>Milliliter</i>
<i>mM</i>	<i>Millimolar</i>
<i>µg</i>	<i>Mikrogramm</i>
<i>µl</i>	<i>Mikroliter</i>
<i>ORI</i>	<i>Startpunkt der Replikation</i>
<i>pfu</i>	<i>Plaque bildende Einheit</i>
<i>S</i>	<i>Svedberg Konstante</i>
<i>SV40</i>	<i>Simian Virus 40</i>
<i>u</i>	<i>Enzymeinheit (unit)</i>
<i>Upm</i>	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
<i>V</i>	<i>Volt</i>
<i>wt</i>	<i>Wildtyp</i>

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

	Seite
Abb.1 <i>Kontrollregion von SV40</i>	2
Abb.2 <i>SV40-T-Antigen Funktionskarte</i>	4
Abb.3 <i>Chemisch-synthetisierte-Oligonukleotid Bindungsstelle für T-Antigen</i>	32
Abb.4 <i>Bindungstest von T-Antigen an viraler DNA (pSVwt) und chemisch-synthetisierten -Oligonukleotid Bindungsstellen (pONwt)</i>	34
Abb.5 <i>Vergleich des DNAase-Schutzes mit gereinigtem T-Antigen und immunpräzipitierten T-Antigen aus lytisch infizierten Zellen</i>	37
Abb.6 <i>Einfluß der Komponenten für die Immunpräzipitation auf die Footprint Analyse</i>	38
Abb.7 <i>Plasmide zur Bindungsuntersuchungen von Bindungsstelle I</i>	40
Abb.8 <i>Dideoxy-Sequenzierung von Plasmiden mit Bindungsstelle I</i>	40
Abb.9 <i>Bindung von COS1-T-Antigen an wt- und mutierte Bindungsstelle I</i>	42
Abb.10 <i>DNAase Footprint Analyse von T-Antigen an pON-DNAs</i>	44
Abb.11 <i>Dideoxy Sequenzierung von pONdlSPaa-DNA</i>	48

Abb.12	<i>T-Antigen Bindung an pONdlSPAa</i>	49
Abb.13	<i>Gel Retention Assay mit pONwt-DNA und COS1-T-Antigen</i>	51
Abb.14	<i>Gel Retention Assay mit gereinigtem T-Antigen</i>	54
Abb.15	<i>Kompetitionsuntersuchung der Bindung an pONwt-DNA</i>	56
Abb.16	<i>Abhängigkeit der Konkurrenz an der Bindungsstelle I von der Menge der Plasmid-DNAs</i>	57
Abb.17	<i>Dideoxy-Sequenzierung der Plasmide mit mehreren Kopien der Bindungsstelle I</i>	59
Abb.18	<i>Bindung von T-Antigen an pONsubPEN 2 und pONdlSPA 3</i>	60
Abb.19	<i>Footprint Analyse der COS1-T-Antigen an pONwt, pONsubPEN 2 und pONdlSPA 3 DNA</i>	62
Abb.20	<i>Kompetitionsuntersuchung der Bindung an pONwt mit pONsubPEN 2 und pONdlSPA 3</i>	63
Abb.21	<i>Nukleotid-Sequenz von Polyoma- und SV40-Kontrollregionen</i>	65
Abb.22	<i>Schematische Darstellung der Polyoma-Plasmide</i>	66
Abb.23	<i>Bindung von SV40-T-Antigen an Polyoma Sequenzen</i>	69
Abb.24	<i>Sequenz in der Kontrollregion von SV40, BK, JC und LPV</i>	70

Abb.25	<i>Bindung des SV40-T-Antigens an BK, JC und LPV DNA</i>	73
Abb.26	<i>Footprint Analyse der Bindung oligomerer Formen von T-Antigen an virale DNA</i>	75
Abb.27	<i>Gel Retention Assay des Komplexes von Bindungsstelle I mit den oligomeren Formen des T-Antigens</i>	77
Abb.28	<i>Gel Retention Assay des Komplexes von Bindungsstelle II mit den oligomeren Formen des T-Antigens</i>	79
Abb.29	<i>Gel Retention Assay von Komplexen der Bindungsstellen I und II mit COS1-Extrakt</i>	81
Abb.30	<i>Footprint mit Extrakten von COS1, VLM und MKSA Zellen</i>	84
Abb.31	<i>Bindung des T-Antigens aus SV40-transformierten Zellen an viraler DNA</i>	86
Abb.32	<i>Bindung des T-Antigens aus COS1 und H65/90B Zellen an viraler DNA bei 0°C und 37°C</i>	88
Abb.33	<i>Footprint Analyse der SV40-Kontrollregion mit Extrakten aus COS1 und H65/90B Zellen</i>	90

I. E I N L E I T U N G

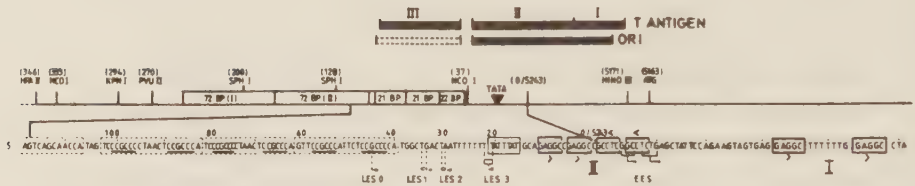
Eines der Hauptziele der heutigen Forschung ist es, die Vorgänge zu verstehen, die eine normale Zelle zu einer Krebszelle umwandeln. Dazu muß man auch Vorgänge wie die Replikation der DNA und die Regulation der Genexpression in normalen Zellen aufklären.

Um diese Mechanismen zu untersuchen, werden verschiedene Modellsysteme verwendet; u.a. bieten sich DNA-Tumoviren als solche Untersuchungsobjekte an, da sie die Eigenschaft besitzen, eukaryontische Zellen zu transformieren. Dabei bedienen sie sich -wie alle Viren- zellulärer Funktionen. Seit 1960 hat das Simian Virus 40 (SV 40), ein Virus der Papova-Gruppe, für zahlreiche Untersuchungen der Transformation und der Replikations- bzw. Transkriptionsprozesse in eukaryontischen Zellen gedient. Der Gruppe der Papova-Viren gehören außerdem das Polyoma-Virus, dessen natürlicher Wirt die Maus ist, und die menschlichen JC, BK und LPV-Viren an, die alle mit SV40 Gemeinsamkeiten in der Genom Organisation teilen.

DAS SIMIAN VIRUS 40

Das Simian Virus 40, SV40, eignet sich als Untersuchungsobjekt, da es ein kleines Genom von 5243 bp besitzt, das die Information für die sechs bis heute bekannten Proteine trägt. Die Funktion des "Agno-Proteins" ist noch ungeklärt. Zwei der Proteine, das große (T-) und das kleine (t-) Tumorantigen, sind regulatorische Proteine. Sie werden unmittelbar, "früh", nach der Infektion exprimiert. Die anderen drei Proteine (VP1-3) sind Strukturproteine und werden erst nach der Initiation der

Replikation, "spät" in der Infektion transkribiert. Die Region zwischen den "frühen" und "späten" Genen ist die Kontrollregion für die Expression dieser Gene und für die Replikation des Genoms (Abb.1).



Baty et al., NAR 12, 915 (1984)

Abb.1 Kontrollregion von SV40

In der oberen Linie sind die drei T-Antigen Bindungsstellen (I, II und III) und der Startpunkt der Replikation (ORI) gekennzeichnet. Die SV40 Koordinaten sind nach dem BBB System (Tooze, 1981) in Klammern angegeben. Die zweite Linie stellt die Sequenz zwischen Nukleotid 5224 und 118 dar. Wichtige Transkriptionskontrollelemente (GC-reiche Repeats, TATA-Box) und einige Startpunkte der frühen Transkription (EES, LES usw.) sind aufgeführt. Die Erkennungspentanukleotide 5'GAGGC 3' von Bindungsstellen I und II sind eingerahmt.

Das SV40 Virus stammt aus der Afrikanischen Grünen Meereskatze. Es besitzt die Eigenschaft sich in permissiven Zellen lytisch zu vermehren, und solche Zellen, die ihm diese Möglichkeit nicht bieten, nicht-permissive Zellen, zu transformieren. Der Vorgang der Transformation setzt voraus,

daß mindestens eine Kopie des Virus-Genoms in die zelluläre DNA eingebaut wird. Für die Transformation ist nur die Expression der "frühen" Gene notwendig (großes und kleines T-Antigen). Die genaue Rolle des kleinen t-Antigens ist aber bis heute unbekannt, da es für die Transformation in vitro bzw. die Tumorerzeugung in vivo nicht essentiell ist. Es scheint nur eine Nebenrolle bei dem Transformationsgeschehen zu spielen.

Übersicht: Tooze, 1981

DAS GROßE TUMOR-ANTIGEN

Das Genprodukt der "frühen" Expression des SV40, das große T-Antigen, kontrolliert die meisten Funktionen bei der lytischen Infektion in permissiven Zellen, sowie bei der Transformation nicht permissiver Zellen.

Es ist ein ca. 90kd Protein, das hauptsächlich im Kern, aber auch mit der Kernmatrix und den Plasmamembranen assoziiert, vorkommt.

Dem T-Antigen werden verschiedene biochemische Aktivitäten zugeschrieben: es besitzt ATPase-Aktivität, bindet Nukleotide und kann an virale und zelluläre DNA binden. Ferner kommt es in verschiedenen aggregierten Formen vor. Das Monomer dient als Vorläufer für eine tetramere Form des Proteins. Der Aggregationsprozeß wird wahrscheinlich durch den Phosphorylierungsgrad des T-Antigens gesteuert.

In transformierten, aber auch in lytisch infizierten Zellen, kommt das T-Antigen als Komplex mit dem zellulären Protein p53, vor.

Das T-Antigen besitzt zahlreiche physiologische Aktivitäten in der Zelle. So kann es die virale Replikation initiieren und seine eigene Expression, sowie die Transkription der "späten" Proteine regulieren.

Weiterhin induziert es die zelluläre DNA-Replikation und

stimuliert die Synthese zellulärer Proteine. Schließlich initiiert es die Transformation und etabliert den transformierten Zustand der Zellen.

Einige der erwähnten Aufgaben konnten bis jetzt durch genetische und biochemische Untersuchungen verschiedener Domänen des Proteins zugeordnet werden (Abb.2). So ist es möglich, manche von ihnen miteinander zu korrelieren, wie zum Beispiel die ATPase-Aktivität mit der Replikation und die Bindung des T-Antigens an der viralen DNA mit der Initiation der Replikation und der Regulation der "frühen" Transkription.

Übersicht: Rigby and Lane, 1983

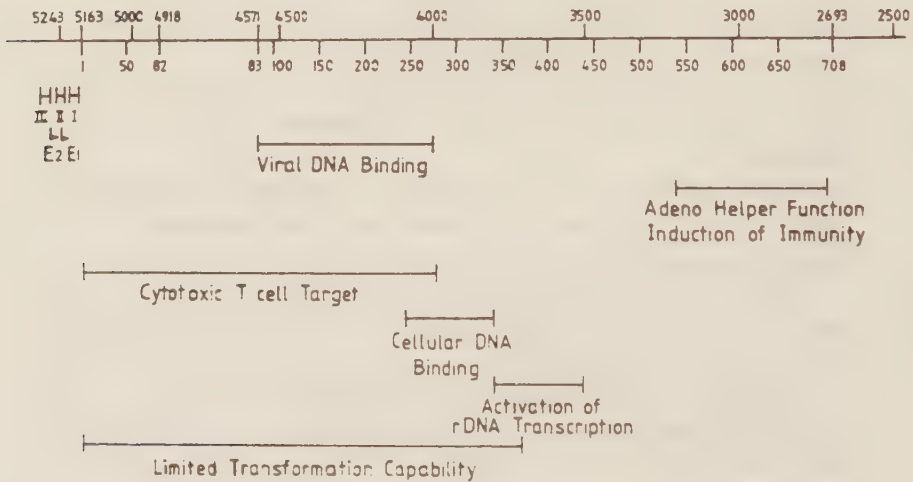


Abb.2 SV40-T-Antigen Funktionskarte

Die Zahlen über der oberen Koordinate entsprechen den Nukleotidzahlen nach der BBB Nummerierung (Tooze, 1981) und die Zahlen unterhalb der Koordinate den Aminosäuren-Nummern im Protein.

INTERAKTIONEN ZWISCHEN T-ANTIGEN UND DNA

Seit 1974 ist bekannt, daß das T-Antigen an doppelsträngige DNA bindet, und Reed et al. haben 1975 gezeigt, daß es spezifisch an SV40-Sequenzen bindet. Zahlreiche Untersuchungen seitdem haben erwiesen, daß das T-Antigen drei Bindungsstellen auf dem viralen Genom besitzt, die entsprechend der Bindungsaffinität des Proteins I, II und III genannt werden, (für Bindungsstelle I stärkste Affinität usw). Bindungsstelle I befindet sich an der "frühen" Seite des Replikationsursprungs (Abb.1), Bindungsstelle II korreliert mit dem genetisch definierten minimalen "ORI" (Startpunkt der Replikation), und die Bindungsstelle III ist an der "späten" Seite des ORI's. Diese Untersuchungen wurden mit dem D2-T-Protein, einem Adenovirus-SV40 Hybrid-Protein aus infizierten HeLa-Zellen (Tjian, 1978) bzw. mit einem defekten T-Antigen aus transformierten menschlichen SV80-Zellen (Shalloway et al., 1980) und mit gereinigtem T-Antigen aus infizierten Zellen (CV-1) (Tegtmeyer et al., 1981) durchgeführt.

Weitere Studien mit diesen Proteinen haben gezeigt, daß für das T-Antigen eine Erkennungssequenz in diesen Bindungsstellen existiert (Tjian, 1978; Tegtmeyer et al., 1981; DeLucia et al., 1983): ein Pentanukleotid mit der Consensus Sequenz 5' -GAGGC- 3', das mehrmals pro Bindungsstelle vorkommt (Tjian, 1978; Tegtmeyer et al., 1983). Die Anordnung dieser Pentanukleotide ist für jede Bindungsstelle unterschiedlich, ein Hinweis für die verschiedenen Affinitäten des Proteins.

Durch Mutationsanalysen haben verschiedene Gruppen gezeigt, daß die Bindung des T-Antigens an der Bindungsstelle I mit der Autoregulation der frühen Genexpression gekoppelt ist (Rio et al.; 1980, Hansen et al., 1981; DiMaio and Nathans,

1982). Untersuchungen durch Mutationen in Bindungsstelle II haben weiterhin bewiesen, daß die Bindung des T-Antigens an dieser Stelle für die Initiation der Replikation notwendig ist (Shortle et al., 1979; DiMaio and Nathans, 1980; Margolskee and Nathans, 1984).

Durch diese Experimente ist eindeutig die Rolle der Bindung des T-Antigens an virale DNA für zwei wichtige regulatorische Vorgänge am viralen Genom nachgewiesen worden. Weiterhin wird vermutet, daß die Interaktion des T-Antigens mit zellulären Sequenzen ebenfalls regulatorische Veränderung einiger Funktionen in der Zelle verursacht, die schließlich zu ihrer Transformation führen.

AUFGABENSTELLUNG

Das Ziel dieser Arbeit war, eine systematische Analyse der Interaktionen des SV40-T-Antigens mit DNA durchzuführen. Dazu wurde untersucht, welche Nukleotidsequenzen für die Bindung des Proteins wichtig sind, und welche Rolle ihre Anordnung und Orientierung dabei spielen. Es war weiterhin interessant zu wissen, wie verschiedene Mutanten-T-Antigene und auch oligomere Formen des Proteins mit der DNA komplexiert werden. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Methoden zur Untersuchung Protein-DNA-Interaktionen ausgearbeitet.

Die Aufklärung der genauen Voraussetzungen für die Interaktion des T-Antigens mit der DNA kann allgemein als Modell für Protein-DNA Wechselwirkungen genutzt werden, da bekannt ist, daß viele regulatorische Vorgänge in der Zelle durch solche Interaktionen gesteuert werden.

II. M A T E R I A L

ZELLEN UND VIRUS

Es wurden folgende Zelllinien verwendet:

- TC7 Affennierenzellen von Dr.W.Deppert, Ulm; (Robb and Huebner, 1973)
- COS1 mit origin-defektem SV40 transformierte CV-1 (Affennieren)-Zellen von Dr.T.Shenk, Princeton; (Gluzman, 1981)
- mKSA SV40 transformierte Balb/c Mausnierenzellen von Dr.W.Deppert, Ulm; (Dubbs et al., 1967)
- VLM SV40 transformierte Balb/c Mausembryozellen von Dr.Brandner, Freiburg; (Zarling and Tevethia, 1973)
- H65/90B mit ^{60}Co -bestrahltem SV40 transformierte Zellen von Syrischen-Hamstern von Dr.W.Deppert, Ulm; (Defendi and Jansen, 1967)
- THK-1t mit SV40 transformierte Zellen von Syrischen-Hamstern von Dr.A.M.Lewis, Bethesda; (Black and Rowe, 1963)
- Hyb 108 Hybridoma Zelllinie von Dr.W.Deppert, Ulm; (Gurney et al., 1986).
- Für die lytische Infektion wurde der Wildtyp-SV40 Stamm SV-S (Takemoto et al., 1966) verwendet.

BAKTERIENSTÄMME

- E.coli K12 Stamm Hb101 (Boyer et al., 1969)
 F^- , pro, leu, thi, lacY, Str^r,
 rk^- , mk^- , EndoI⁻,
 $recA^-$
- E.coli K12 Stamm Fp3p3 von B.Seed, (Levinson et al., 1984)
 $argE^-$, lac, proXIII mit p3: RPI,
 $Amp^{(am)}$, Tet $^{(am)}$, tra⁻ und F'

(JM103): F'⁺lacI^q, lacZ, M15,
proAB⁺, traD36

Staphylococcus aureus Stamm CowanI, (Kessler et al., 1975)

PLASMIDE

- pAT153** Derivat von pBR322 (Amp^r, Tet^r; Sutcliffe, 1979) entstanden durch eine Deletion von den HaeII B und C Fragmenten (1646-2351); Twigg and Sherratt (1980).
- pSVwt** wt-SV40 eingebaut in die BamHI Stelle von pAT153; Fanning et al. (1982).
- pEP392** HindIII-C Fragment von SV40 kloniert in die BamHI-Stelle von pAT153; Fanning et al. (1982).
- p1097** cs-Mutante von SV40 mit einer Deletion von 31bp (5177-5208) von DiMaio and Nathans (1982) eingebaut in die BamHI-Stelle von pAT153; Huber et al. (1985).
- pSDL13** Plasmid mit M13ori, ColEori, lacZ-Fragment von pUC13 und supF; Levinson et al. (1984).
- pON-Serie** 25bp langes synthetisches Oligonukleotid (5191-5209 von SV40) kloniert in die BamHI-Stelle von pAT153 (vergleiche Abb.7); Ryder et al. (1985).
- pdl2015** Polyoma mit Deletion zwischen 4654 und 68 kloniert in die BamHI-Stelle von pAT153; Cowie et al. (1984).
- pdl2019** Polyoma mit Deletion zwischen 4831 und 36 kloniert in die BamHI-Stelle von pAT153; Cowie et al. (1984).
- pdl3035** Polyoma mit Deletion zwischen 86 und 1333 kloniert in die BamHI-Stelle von pAT153; Cowie et al. (1984).
- pΔ81** Polyoma mit Deletion zwischen 43 und 147 kloniert in die BamHI-Stelle von pMK16⁺; Katinka et al. (1980).

- pBK* *BK-Virus kloniert in die BamHI-Stelle von pBR322; Seif et al. (1979).*
- pJC* *JC-Virus kloniert in die BamHI-Stelle von pBR322; Frisque (1983).*
- pLPV* *LPV kloniert in die BamHI-Stelle von pBR322; Pawlita et al. (1985).*

SEREN UND MEDIEN

Firma Biochrom KG, Berlin:

Fötales Kälberserum, Serum neugeborener Kälber.

Firma Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA:

Bacto-Agar, Hefe-Extrakt, Trypton.

Firma Gibco Europe GmbH, Karlsruhe:

DME, Fötales Kälberserum, Serum neugeborener Kälber.

ENZYME

Restriktionsenzyme:

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen bezogen: Amersham Buchler, Braunschweig; Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu Isenburg; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim; New England Biolabs, Schwalbach; Pharmacia, Freiburg; Renner GmbH und Stehlin, Basel.

Andere Enzyme:

Amersham Buchler, Braunschweig: DNA-Polymerase I/Klenow-Fragment, T4-Polynukleotidkinase.

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim: alkalische Phosphatase, B-Galactosidase.

New England Biolabs, Schwalbach: T4-DNA-Ligase

Sigma: Lysozym

Worthington Biochemical Corporation, Freehold, USA: DNAase I

CHEMIKALIEN UND ANDERE MATERIALIENFirma Amersham und Buchler, Braunschweig: γ ³²P ATP (3000 Ci/μmol), α³²P dATP (3000 Ci/μmol),α³²P dCTP (3000 Ci/μmol), α³⁵S dATP (600 Ci/μmol).Firma Baker Chemicals, Deventer, Holland:

Lipoluma, Lumasolve.

Firma Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm:

Formamid, Cäsiumchlorid.

Firma Kodak Limited:

Röntgenfilme XS-1, XAR-5.

Firma E. Merck AG, Darmstadt:

Ammoniumacetat, Ammoniumbicarbonat, Borsäure,
 Kalziumchlorid, Diethylether, Dinatriumhydrogenphosphat,
 Ethanol p.A., Ethylen-dinitrilo-tetraessigsäure (EDTA),
 Essigsäure p.A., Glucose, Glycerin, Glycin, Harnstoff,
 Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat,
 Kaliumacetat, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Methanol,
 Natriumacetat, Natriumazid, Natriumcarbonat, Natriumchlorid,
 Natriumcitrat, Natriumdihydrogenphosphat,
 Natriumdodecylhydrogensulfat (SDS), Natriumhydrogencarbonat,
 Natriumhydroxid, Natriumtetraborat, Phenol,
 Polyethylenglykol (PEG 6000), Salzsäure 25%, Saccharose,
 Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Zinkchlorid.

Firma Nunc GmbH, Wiesbaden:

Gewebekulturschalen.

Firma Pharmacia Fine Chemicals, Freiburg:

Ficoll, Protein-A-Sepharose CL-4B, Sephadex G-50.

Firma Serva, Heidelberg:

Acrylamid, Ammoniumperoxodisulfat, Ampicillin,
Bromphenolblau, Hämoglobin, Kanamycin, Lysozym,
N,N'-Methylen-bisacrylamid, Penicillin, Streptomycin,
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin (TEMED), Trypsin,
Triton X-100, Xylencyanol.

Firma Sigma:

Adenosin-5'-triphosphat (ATP),
Adenosin-5'-O-(3-thiotriphosphat) (ATP_γ-S),
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP),
2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat (dCTP),
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP),
Dimethylaminopropionitril (DMAPN), Dithiothreitol (DTT),
Glykogen, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
(Hepes), o-Nitrophenyl-β-galaktosid (o-NPG),
p-Nitrophenylphosphat-Tabletten (NPP), Nonidet P-40 (NP-40),
Polyvinylpyrrolidon (PVP-40), Phenylmethylsulfonylfluorid
(PMSF), Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES),
Ribonuklease, Rinderserumalbumin, Spermidin,
Thymidin-5'-triphosphat.

III. M E T H O D E N

ZELLINIEN - VIRUS

Alle Zellen wurden in Einschichtkultur gezüchtet. Dazu wurden die Zellen in Plastik-Zellkulturschalen (Durchmesser 14cm) bei 37°C in einem Luft/5%CO₂-Gemisch kultiviert. Als Nährlösung diente Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (Dulbecco und Freeman, 1959), das 5% fötales oder 8% Serum aus neugeborenen Kälber enthielt.

Die Hybridoma Zelllinie Pab 108 (Gurney et al., 1986) wurde in 15% fötalem Kälberserum und Dulbecco's Medium gezüchtet. Wenn der Zellrasen nahezu konfluent war, wurde das Medium abgossen, die Zellen mit Trypsin gewaschen und mit 1ml Trypsin (37°C) inkubiert. Sobald sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst hatten, wurden sie in Röhrchen abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Kulturmedium (37°C) aufgenommen und auf neue Kulturschalen übertragen. Die Passagen erfolgten gewöhnlich in 1:3 bis 1:5 Verdünnungen.

Medium: 10 g/l DME

40 mg/l Penicillin

80 mg/l Streptomycin

100 mg/l Kanamycin

3.75 g/l NaHCO₃

(pH6.8)

VIRUSVERMEHRUNG

Für die Vermehrung von SV40 wurden subkonfluent gewachsene TC7-Zellen (1-2x10⁷ Zellen) einmal mit Kulturmedium gewaschen und anschließend mit 2ml SV40 infiziert (1-5 pfu/Zelle).

Die Adsorption erfolgte bei 37°C 2h lang, danach wurden

die Zellen mit Kulturmedium aufgefüllt und für 48h inkubiert.

Die Viruspräparation wurde, wie bei Baumgartner et al. (1979) beschrieben, durchgeführt.

ZELLEXTRAKT-PRÄPARATION

Konfluente Zellen wurden dreimal mit kalter HANKS-Lösung gewaschen, von der Kulturschale abgeschabt und in einem Eppendorf-Gefäß abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 100 µl (für die Gradiententrennung) oder 1 ml (für restliche Assays) Lysis Puffer (nach Smith et al., 1978) resuspendiert und eine halbe Stunde lang bei 4°C extrahiert. Die Suspension wurde in einer Eppendorfsentrifuge bei 4°C für 5min zentrifugiert; der Überstand wurde für Bindungsexperimente oder für die weitere Auftrennung auf einem Saccharosegradienten verwendet.

HANKS: 140mM NaCl

5mM KCl

0.5mM MgCl₂

0.4mM MgSO₄

1.3mM CaCl₂

0.34mM Na₂HPO₄

5mM Glucose

0.44mM KH₂PO₄

0.42mM NaHCO₃

Lysis Puffer: 50mM TrisHCl

120mM NaCl

0.5% NP-40

(pH9.0)

DICHTEGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION DER ZELLEXTRAKTE

Um die Proteine aus dem Rohextrakt der Größe nach trennen zu können, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (Dorn et al., 1982).

Der Überstand nach der Extraktion von zwei konfluenten Kulturschalen (200 µl) wurde auf einen kontinuierlichen 15-30% Saccharose Dichtegradienten einem 60% Saccharose Kissen in Puffer A überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 45000 Upm für 21,5h bei 4°C in einem SW55

Rotor. Vom Boden des Gradienten aus wurden Fraktionen von je 0.2 ml gesammelt. Parallel dazu wurde ein Gradient mit Hämoglobin (4.3S), B-Galactosidase (16S) und alkalischer Phosphatase (6.3S) als Markerproteine zentrifugiert. Der Markergradient wurde auch in Fraktionen gesammelt.

Die Markerproteine wurden durch folgende Tests nachgewiesen:
Hämoglobin: Absorptionsbestimmung bei 540nm.

Alkalische Phosphatase: Enzymaktivitätstest mit 25 µl Fraktion und 200 µl NPP-Mischung aus 2 g Triethanolamin und 4 NPP (p-Nitrophenyl-Phosphat) Tabletten in 20 ml (5 mg/Tablette). Nach Inkubation bei 37°C für 30min und Beendigung der Reaktion mit 25 µl 4N NaOH wurde die Adsorption bei 400 nm gegen der NPP-Mischung in Puffer A gemessen.

B-Galactosidase: Die Enzymaktivität in 50 µl jeder Fraktion wurde mit 1 ml Z-Puffer und 0.2 ml o-NPG (o-Nitrophenyl-D-Galactopyranosid) (4 mg/ml) nach Inkubation bei 28°C für 10min bei 420nm gemessen (Reaktionsbeendigung mit 0.5 ml 1M Na₂CO₃).

Die Fraktionen, die 5S, 7S und 14S Proteine enthielten, wurden jeweils zusammengepoolt und für DNA-Bindungsexperimente verwendet.

Z-Puffer: 60mM Na₂HPO₄

40mM NaH₂PO₄

10mM KCl

10mM MgSO₄

5mM Mercaptoäthanol

ENZYMATISCHE REAKTIONEN MIT DNA

REINIGUNG UND KONZENTRIERUNG DER DNA

Bevor die DNA in enzymatische Reaktionen eingesetzt wurde, mußte sie von möglichen Verunreinigungen befreit werden. Dazu wurde die DNA-haltige Probe mit dem gleichen Volumen

Phenol ausgeschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation aufgetrennt. Nach Entfernen des Phenols wurde nochmal zentrifugiert und die wäßrige Phase noch 3-4mal mit Ether ausgeschüttelt, um das restliche Phenol zu entfernen.

Um die DNA zu konzentrieren, wurde 1/10 Volumen 3M Natriumacetat dazugegeben; die DNA wurde dann mit einem 3fachen Volumen 96% Ethanol bei -70°C aufbewahrt und präzipitiert, mit kaltem 80% Ethanol gewaschen und anschließend im Exsikkator unter Vakuum getrocknet. Danach wurde die DNA in die jeweils gewünschte Konzentration in H_2O oder TE aufgenommen.

Die Konzentration der DNA wurde durch Messen der Absorption bei 260nm gegen den verwendeten Puffer bestimmt ($A_{260\text{nm}}=1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA).

TE: 10mM Tris-HCl

1mM EDTA, pH7.8

SPALTUNG DER DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

In die Enzymreaktion wurden 100 $\mu\text{g/ml}$ DNA eingesetzt. Die Salzbedingungen wurden nach den Angaben der Herstellerfirmen als 10x Puffer eingestellt und die Reaktion erfolgte mit ein oder mehreren Enzymeinheiten bei der angegebenen Temperatur für 2 Stunden.

Die Inkubation wurde durch Erwärmen auf 65°C oder durch Zugabe von 0.5M EDTA beendet.

DEPHOSPHORYLIERUNG

Die Abspaltung der Phosphatreste an den 5'-Enden der DNA-Restriktionsfragmente war nötig, um die Markierung dieser Enden mit radioaktivem $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und T4-Polynukleotid-Kinase zu ermöglichen.

Durch Zugabe von 50mM Tris, 100mM MgCl_2 und 10mM ZnCl_2 wurden die für die Reaktion benötigten Salzbedingungen eingestellt. Die Reaktion erfolgte mit 1-2 Einheiten alkalischer Phosphatase bei 37°C für eine

Stunde. Am Ende der Inkubation wurde der Ansatz bei 65°C für 10 min erhitzt und die Reaktion durch Zugabe von 0.5M EDTA (1:10) gestoppt. Durch Phenolextraktion wurde das Enzym entfernt, und die DNA durch Ethanolzugabe gefällt. Zur Vorbehandlung des Enzyms wurde ein $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Präzipitat der alkalischen Phosphatase in 50mM Tris, 1mM MgCl_2 und 0.1mM ZnCl_2 aufgenommen, gegen denselben Puffer dialysiert und in dieser Lösung bei 4°C aufbewahrt.

MARKIEREN VON 5'-ENDEN MIT POLYNUKLEOTID-KINASE

Die nach der Phosphatasereaktion gefällte DNA (1-5 µg) wurde in 20mM Tris pH9.5, 1mM Spermidin, 0.05mM EDTA und TE, 5 Minuten auf 60°C erhitzt und dann auf 0°C abgekühlt. Die Lösung wurde dann auf eine Endkonzentration von 50mM Tris pH9.5, 10mM MgCl_2 , 5mM DTT und 5% Glycerin eingestellt. Nach Zugabe von 20 Einheiten Polynukleotid-Kinase und 50µCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP wurde die DNA bei 37°C 45 Minuten lang inkubiert und anschließend mit 0.3M NaAcetat und 96% Ethanol präzipitiert, um den größten Teil der nicht eingebauten Triphosphate abzutrennen.

MARKIEREN VON 3'-ENDEN MIT KLENOW POLYMERASE

Zu 1 µg DNA in 0.5M Tris pH7.2, 0.1M MgSO_4 und 1mM DTT wurden die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (2nmol von jedem), eine Einheit Klenow Fragment und 50µCi von $\gamma^{32}\text{P}$ dNTP zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 20°C wurde die Reaktion mit 1 µl 0.5M EDTA gestoppt.

LIGASE

Die zu verknüpfende DNA Fragmente wurden nach der Isolierung aus einem Agarose Gel im Verhältnis 1:10 in einer Lösung mit 66mM TrisHCl pH7.6, 10mM MgCl_2 , 10mM DTT, 1mM EDTA und 10mM ATP zugegeben. Die Reaktion wurde mit mehreren Einheiten T4 DNA Ligase bei 14-16°C 10-24 Stunden lang

durchgeführt.

CHARAKTERISIERUNG DER DNA

AUFTRENNUNG AUF AGAROSE GELEN

Die Identifizierung von DNA und die Auftrennung von DNA Fragmenten, die größer sind als 200bp, erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

Dabei wurden zwei verschiedene Größen horizontaler Gelapparaturen benutzt; für schnellere Auftrennung wurde ein Hoefer-Minnie HE33, sonst eine größere Apparatur für 20cm lange Gele verwendet.

Die Konzentration der Agarose war je nach Größe der DNA-Fragmente 0.8-2%, und als Gellaufpuffer wurde TEB verwendet. Die abgewogene Agarose wurde im Mikrowellen-Herd aufgekocht und bei 60°C aufgegossen.

Der Lauf erfolgte bei kleinen Gelen bei 120V ca.1h und bei größeren bei 40-60V 10-16 Stunden lang.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 10min in einer EtBr-Lösung (1 mg/l) angefärbt und unter UV Licht (254nm) mit einer Polaroid-Kamera mit Orangefilter auf Polaroid-Film (Typ 107) fotografiert (Blende 11, 10-60 Sekunden).

TEB: 89mM TrisHCl, pH8.0

89mM Borsäure

2mM EDTA

ISOLIERUNG VON DNA AUS AGAROSE GELEN

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das Verfahren von Wiberg und Hammar skjöld (1980) verwendet.

Die DNA wurde durch Elektrophorese auf einem Agarose-Gel aufgetrennt; ein Teil des Gels wurde anschließend mit EtBr gefärbt. Die Bande, die isoliert werden sollte, wurde unter UV-Licht auf dem Gel markiert. Mit einem Skalpell wurde dann in Laufrichtung der DNA auf dem nicht gefärbten Teil des

Gels hinter der markierten Bande ein zurecht geschnittenes, vorbereitetes DEAE-Cellulose Stück (Schleicher und Schüll, NA-45) eingesetzt und die Elektrophorese für eine kurze Dauer fortgesetzt. Das DEAE-Membran Stück hatte man vorher 10min in 10mM EDTA pH7.6, 5min in 0.5N NaOH, mehrmals in Wasser gewaschen und schließlich in Wasser bei 4°C aufbewahrt.

Nach dem Lauf wurde das DEAE-Stückchen in NET-Puffer gewaschen, und die DNA in 200 µl Hochsalz-NET für eine Stunde lang bei 68°C eluiert. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt.

NET-Puffer: 150mM NaCl

0.1mM EDTA

20mM Tris-HCl, pH8

NET-Hochsalz-Puffer: 1M NaCl

0.1mM EDTA

20mM Tris-HCl, pH8

AUFTRENNUNG AUF POLYACRYLAMIDGELE

Die DNA Fragmente, die aus den Polyacrylamid-Gelen isoliert wurden, sind vorher mit ^{32}P -ATP radioaktiv markiert worden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde eine Glasplatte entfernt und das Gel mit radioaktiver Farbstoff-Lösung an drei Stellen markiert. Auf dem mit Folie bedeckten Gel wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und in einer Siemens-Kassette für 10min bei 4°C exponiert. Die zu isolierende Bande wurde durch die Autoradiographie lokalisiert und aus dem Gel geschnitten; das Gelstückchen wurde in 0.5 ml Elutionpuffer bei 37°C über Nacht inkubiert.

Das Gelstückchen wurde danach für 10min abzentrifugiert, mit 0.1 ml Elutionspuffer gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Pasteurpipette, die Glaswolle enthielt, filtriert, damit Acrylamidstücke zurückgehalten werden. Das eluierte Fragment konnte durch Fällern mit

Ethanol aus der Salzlösung erhalten werden. Anschließend wurde die DNA noch einmal in TE gelöst und gefällt.

Elutionspuffer: 0.5M Ammoniumacetat

1mM EDTA

0.1% SDS

DNA-SEQUENZIERUNG

-nach dem Dideoxyverfahren an doppelsträngiger DNA (Wallace et al., 1981; Chen and Seeburg, 1985).

Der für die Sequenzierung benötigter Primer wurde wie bei der Oligonukleotid-gesteuerte-Mutagenese gereinigt und bei -20°C aufbewahrt.

Die DNA wurde nach der Schnell-Aufschluß Methode präpariert. Das Volumen von 2 µg DNA wurde getrocknet und anschließend die DNA mit 40 µl Denaturierungspuffer (0.2M NaOH und 0.2mM EDTA pH8.0) für 5min bei Raumtemperatur denaturiert und danach durch Zugabe von 4 µl 2M Ammoniumacetat pH4.5 neutralisiert. Die DNA wurde mit 96% Ethanol und Salzen präzipitiert und mit 80% Ethanol gewaschen.

Für die Annealing-Reaktion wurde die getrocknete DNA in einem Volumen von 10 µl aufgenommen, mit 10xAnnealing-Puffer, 2.5pmol Primer und ca. 16µCi ³⁵S-dATP für 15min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 2u Klenow-Polymerase versetzt und in vier Eppendorfgefäße, die 2 µl der entsprechenden dNTP/ddNTP Mischung für die vier Nukleotiden enthielten, aufgeteilt. Die Reaktion wurde 20min bei 30°C und anschließend mit 1 µl "Chase"-Lösung (0.125mM dNTP) pro Gefäß für weitere 15min inkubiert.

Die Proben wurden dann unter Vakuum getrocknet und in 4 µl Formamid-Farbstoff-Mix (98% Formamid, 10mM EDTA pH8.0, 0.2% Bromphenolblau, 0.2% Xylencyanol) aufgenommen.

Die Gelelektrophorese wurde mit 8M Harnstoff /8%Polyacrylamidgel bei 2000V (nach einem Vorlauf von 30min) mit TEB-Elektrodenpuffer durchgeführt.

10x Annealing-Puffer: 70mM Tris-HCL pH7.5
 70mM MgCl₂
 300mM NaCl
 100mM DTT
 1mM EDTA

	A-Mix	C-Mix	G-Mix	T-Mix	μ M
dTTP	100	100	100	5	
dCTP	100	10	100	100	
dGTP	100	100	5	100	
ddGTP	-	-	120	-	
ddCTP	-	100	-	-	
ddATP	100	-	-	-	
ddTTP	-	-	-	500	

BAKTERIENZUCHT

VERMEHRUNG VON BAKTERIEN AUF AGARPLATTEN

Plasmid-enthaltende E.coli Bakterien wurden auf L-Broth-Vollmedium Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Herstellung des Mediums wurden 10g Bacto-Trypton, 10 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl und 15 g Bacto-Agar in 1 l destilliertem Wasser autoklaviert, auf 60°C abgekühlt, mit einer sterilen Lösung des entsprechenden Antibiotikums auf eine Endkonzentration von 50 μ g/ml Ampicillin und/oder 12.5 μ g/ml Tetracyclin oder 25 μ g/ml Kanamycin gebracht und auf 10cm-Nunc-Platten ausgegossen. Die Platten kühlten bis zum Erstarren bei Raumtemperatur ab und wurden bei 4°C aufbewahrt.

VERMEHRUNG VON BAKTERIEN IN FLUSSIGKULTUR

L-Broth Medium (wie oben beschrieben - ohne Agar) wurde autoklaviert und mit Antibiotikum versetzt. Nach der

Animpfung mit Bakterien wurden die Medium-enthaltenden Erlenmeyer-Kolben bei 37°C auf einer rotierenden Schüttelapparatur (150-200U/min) inkubiert.

HERSTELLEN VON TRANSFORMATIONS-KOMPETENTEN BAKTERIEN

(nach Cohen et al., 1972)

100 ml L-Broth Medium wurde durch 1:100 Verdünnung einer Bakterien-Übernachtskultur (Hbl01 für Transformation mit pBR322 und pAT153, Fp3p3 für Transformation mit pSDL13) angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 0.4 für Hbl01, 0.2 für Fp3p3 bei 580nm wurde die Bakterienkultur 5min bei 5000 Upm abzentrifugiert und im halben Volumen von kaltem 0.05M CaCl₂ (50 ml) vorsichtig aufgelöst.

Nach 15min bei 0°C wurde es nochmal bei 5000 Upm, 5min zentrifugiert und in einem 1/20 des Volumens 0.05M CaCl₂ (5 ml) aufgenommen und 2 Stunden auf Eis inkubiert.

Diese Bakterien wurden entweder direkt zur Transformation benutzt oder mit flüssigem Stickstoff bei -70°C in Aliquots von 200 µl eingefroren.

AUFBEWAHRUNG

Um Bakterienstämme für längere Zeit aufzubewahren wurden Übernachtskulturen im Flüssigmedium mit 50% Glycerin versetzt und bei -20°C und -70°C eingefroren.

Für kürzere Lagerung wurden L-Broth Agarplatten mit den Bakterienstämmen mit Parafilm umwickelt und bei 4°C aufbewahrt.

IDENTIFIZIERUNG REKOMBINANTER PLASMIDE

EINZELKOLONIE GELELEKTROPHORESE

(nach Avril Arthur)

Zur schnellen Charakterisierung der DNA von rekombinierten Plasmiden wurden die Einzelkolonien auf 1cm^2 Fläche auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Von diesem Bakterienrasen wurde mit einem Zahnstocher die Hälfte abgeschabt und in $100\ \mu\text{l}$ 10% Ficoll, 5% SDS, 0.05% Bromphenolblau aufgelöst. Diese Suspension wurde 15min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15min bei $9000g$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig auf 0.8% Agarose-Gele aufgetragen, die nach dem Lauf in einer RNase-enthaltenden EtBr-Lösung gefärbt und unter UV-Licht fotografiert wurden.

SCHNELLMETHODE ZUR ISOLIERUNG VON PLASMID DNA DURCH ALKALISCHEN AUFSCHLUß

(nach Maniatis et al., 1982)

$1.5\ \text{ml}$ einer $5\ \text{ml}$ Übernachtskultur wurden in einem Eppendorf-Gefäß abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in $100\ \mu\text{l}$ einer kalten gepufferten Lysozymlösung resuspendiert und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. $200\ \mu\text{l}$ frisch bereiteter 0.2M NaOH, 1% SDS-Lösung wurden zugesetzt und durchgemischt. Nach 5min auf Eis wurden $150\ \mu\text{l}$ einer eiskalten 5M Kaliumacetatlösung, $\text{pH} 4.8$ zum Neutralisieren dazugegeben und weitere 5min bei 0°C inkubiert. Das Lysat wurde 5min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und nach einer Phenolextraktion durch Ethanolzugabe gefällt. Der DNA Niederschlag wurde in TE Puffer gelöst und entweder für die Elektrophorese oder zur Spaltung mit Restriktionsenzymen eingesetzt.

ISOLIERUNG VON PLASMIDEN ÜBER DICHTEGRADIENTENZENTRIFUGATION

(nach Vinograd et al., 1963)

Die Bakterien einer 250 ml Übernacht-Kultur wurden erst durch Zugabe von Chloroform (0.1%) in ihrem Wachstum gehemmt und dann durch Zentrifugation (6000 Upm, 10min, 4°C) geerntet. Das Sediment wurde in 4 ml eiskalter 50mM Tris-HCl, pH8.0 mit 25% Saccharose gelöst und mit 250 µl einer 20 mg/ml Lysozym-Lösung bei 0°C, 5min inkubiert. Anschließend wurde mit 6.25 ml einer TritonX100-Lösung bis zum Auftreten einer viskosen Lösung lysiert und bei 15000Upm 2h bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 g/ml festem CsCl und 1 mg/ml EtBr (10 mg/ml Stammlösung) versetzt und im VTi50-Rotor, 20h, bei 44000 Upm zentrifugiert.

Nach Ablauf der Zentrifugation wurde die Plasmidbande unter langwelligen UV-Licht (366nm) aus dem Gradienten durch Einstechen gesammelt. Das Ethidiumbromid wurde durch dreimalige Extraktion mit CsCl-gesättigten Isopropanol entfernt, und die DNA Lösung gegen TE mehrmals dialysiert. Die DNA wurde dann mit Ethanol gefällt und weiterverarbeitet.

DNA-PROTEIN BINDUNGSEXPERIMENTE

PRÄPARATION VON STAPHYLOCOCCUS

Staphylococcus aureus, Stamm Cowan I, wurde nach der Methode von Kessler (1975) von Frau U.Markau isoliert und anschließend bei -20°C in 1 ml Portionen aufbewahrt. Vor dem Gebrauch wurde die Staphylococcus Suspension abgetaut, abzentrifugiert und in 0.9 ml NET aufgenommen. Nach 15min bei Raumtemperatur wurden die Bakterien fünfmal

mit NET (50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40) gewaschen und schließlich wieder in 0.9 ml NET aufgenommen.

REINIGUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN

(nach By et al., 1978)

Die monoklonalen Antikörper wurden aus Hybridoma-Überständen über eine Protein A-Sepharose Säule von B. Vogt gereinigt. Dazu wurde 1 g Protein A Sepharose im NET Puffer zum Quellen gebracht und dann mit 100-300 ml des Hybridoma Überstands gemischt.

Diese Lösung wurde über Nacht geschüttelt und danach in eine Säule gefüllt. Vor der Elution wurde die Säule mit NET Puffer gewaschen (bis zu einer Absorption bei 280nm von 0). Der Antikörper wurde dann mit 0.25M Glycin HCl-Puffer pH2.4 eluiert. Die gesammelte Fraktionen (je 0.5-1 ml) wurden mit Tris neutralisiert und ihre Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Die Proben, die IgG enthielten, wurden gegen Borat-Puffer dialysiert.

Borat-Puffer: 0.1M Borsäure

0.03M Natriumtetraborat

0.1M NaCl

MESSUNG DER RADIOAKTIVITÄT IN GELSTÜCKCHEN

Mit Hilfe der Autoradiographie wurden die DNA-Banden aus dem getrockneten Gel ausgeschnitten und in ein Scintillationsgefäß mit 5 ml Scintillationsflüssigkeit (10 Teile Lipoluma, 1 Teil Lumasolve und 0.2 Teile Wasser) über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Radioaktivität wurde dann in einem Philips PW 4700 Scintillationsgerät gezählt.

MODIFIZIERTER DNA BINDUNGSTEST

In diesem modifizierten McKay-Bindungstest (Huber et al., 1985; McKay and DiMaio, 1981) formten die Proteine erst mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper und dem Protein A

von der Oberfläche von *Staphylococcus aureus* einen Immunkomplex, der von den restlichen Extraktproteinen durch Waschen befreit wurde. Mit diesem angereicherten Protein wird dann die DNA Bindung durchgeführt.

Dazu wurden 100 μ l Proteinextrakt (1/10 einer 14cm Kulturschale) mit Bindungspuffer auf 75-80mM Salzkonzentration eingestellt. Dabei wurde als Bindungspuffer meist PNE benutzt und bei einigen, in dem Kapitel "Ergebnissen" angegebenen Experimenten, Puffer A. Der Extrakt wurde mit 5 μ g Pab 108 bzw. Maus-IgG für 1h, bei 4°C inkubiert, bevor 30 μ l Formaldehyd-fixierte *Staphylococcus*-Lösung zugegeben wurden. Nach 30min bei 4°C wurden die Immunkomplexe dreimal mit NET oder PNE gewaschen und in 80 μ l Bindungspuffer (PNE) in einer geeigneten Salzkonzentration aufgenommen. Um unspezifische Bindung zu vermeiden wurden 20 μ l Glykogen (20 μ g) und 10 μ l BSA (0.1 mg) für 30min mit dem Komplex inkubiert, bevor die spezifisch markierte DNA (0.25 μ g) dazugegeben wurde. Die Bindung erfolgte für 2h bei 0°C. Danach wurden die Immunkomplexe dreimal mit NET gewaschen und in 20 μ l "Sample Puffer" (125mM Tris, pH8.3, 20% Glycerin, 4% SDS, 10% 2-Mercaptoethanol) aufgenommen.

Um die Proteine von der DNA abzutrennen, wurde der Testansatz bei 65°C, 10min inkubiert und der Überstand nach einer Zentrifugation auf ein 2% Agarose Gel aufgetragen. Als Marker DNA dienten 12.5 ng der eingesetzten radioaktiv markierten Plasmid-DNA (1 μ l in 20 μ l NET und 20 μ l "Sample"-Puffer; davon 10 μ l auf das Gel aufgetragen). Nach der Elektrophorese wurden die Gele für eine halbe Stunde in Ethanol fixiert, getrocknet und bei -70°C autoradiographiert (mit XS-1 Kodak Film).

PNE: 20mM Pipes pH7.8	Puffer A: 10mM Hepes pH7.8
0.1mM EDTA	5mM KCl
10% Glycerin	1mM DTT

0.5mM MgCl₂

1mM PMSF

FOOTPRINT ANALYSE

Mit diesem Verfahren von Galas und Schmitz (1978) werden durch Proteine gebundene DNA Regionen vor DNAase abbauender Aktivität geschützt und auf denaturierenden Gelen charakterisiert.

Die Protein-Immunkomplexe wurden, wie schon beschrieben, vorbereitet und anschließend in 0.1 ml PNE Puffer aufgelöst. Zu jedem Ansatz wurden 2-5 ng 3'-markierte DNA Fragmente zugegeben und für 2h bei 0°C inkubiert. Die Komplexe wurden dann dreimal mit PNE gewaschen und in 100 µl PNE wieder aufgenommen. Die DNAase Reaktion erfolgte mit 0.05-0.1 u des Enzyms (in 20mM Pipes, 0.1mM EDTA, 1mM NaCl, 0.5M MgCl₂ und 0.05M CaCl₂) für 5min bei 0°C.

Die Reaktion wurde mit dem gleichen Volumen der "Stop-Lösung" (1M NH₄-Acetat pH6.0, 0.2% SDS, 0.1mM EDTA) beendet. Durch Erwärmen bei 60°C für 10min löste sich die DNA aus dem Komplex und blieb durch Zentrifugation im Überstand.

Nach Zugabe von Ethanol wurde die DNA gefällt und in 90% Formamid, Bromphenolblau, Xylencyanol und Glycerin aufgenommen.

Proben mit gleichen cpm wurden auf 8% Polyacrylamid Sequenzgele aufgetragen. Die Gele wurden nach dem Lauf bei ca. 1000V in 10% Essigsäure und 2% Glycerin fixiert, getrocknet und zur Autoradiographie mit XS-1 oder XAR-5 Kodak Filme bei -70°C verwendet.

GEL RETENTION ASSAY

Dieses Verfahren von Fried und Crothers (1981) beruht auf dem Prinzip, daß DNA-Fragmente, die durch ein gebundenes Protein komplexiert sind, in einem Polyacrylamidgel langsamer laufen als gleichlange freie DNA Fragmente.

5 μ l aus dem rohen Proteinextrakt (1:200 einer 14cm Nunc Platte) wurden mit 2.5 μ l (4 ng) eines radioaktiv markierten DNA-Fragments 1h bei 0°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einer Lösung, die 1.8 μ g beschallte E.coli DNA und TE pH7.5 enthielt. Wenn die Kompetitionversuche durchgeführt wurden, ersetzte man einen Teil der E.coli DNA mit der gleichen Menge spezifischer oder unspezifischer Plasmid-DNA. Die Plasmid-DNA war mit den gleichen Enzymen gespalten, wie das zugesetzte radioaktiv markierte Fragment. Das Gesamtvolumen jedes Ansatzes betrug 25 bis 30 μ l. Nach der Inkubation wurden 10 μ l Farbstoffmarker (Bromphenolblau und Xylencyanol) in Glycerin und TE zu jedem Aliquot dazugegeben und sofort auf ein 6%iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde aus einer Polyacrylamidlösung im Verhältnis 29:1 von Acrylamid zu N-N'-Methylen-Bisacrylamid angesetzt. Vor dem Auftragen der Proben wurde ein Vorlauf für 30min durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 10V/cm für 2h mit zirkularisiertem Elektrodenpuffer (10mM Tris Acetat, 1mM EDTA pH7.8). Nach dem Lauf wurde das Gel in einem Methanol (40%) - Essigsäure (10%) - Bad fixiert, getrocknet und zur Autoradiographie verwendet.

OLIGONUKLEOTID-GESTEUERTE MUTAGENESE

EINZELSTRANG ISOLIERUNG

(nach Dente et al., 1983)

Um die Einzelstrang-DNA zu erhalten, ließ man die Zellen (E.coli Stamm Fp3p3) mit dem Plasmid pSDL13 (bzw. seine Derivate) in 20 ml Kulturmedium bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0.3 bei 586nm wachsen. Dann wurden die Zellen mit M13 (50 pfu) infiziert und für weitere 10h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal bei

8000 Upm für 10min im SS34-Rotor der Sorvall Zentrifuge abzentrifugiert. Der Phage-enthaltende Überstand wurde mit 1/5 Volumen 20% PEG 6000 und 2.5M NaCl bei 4°C für 30min aufbewahrt, und für 10min bei 10000 Upm abzentrifugiert. Die gefällte Einzelstrang-DNA wurde in 3 ml TE aufgenommen und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Nach der Ätherbehandlung wurde die DNA in Aliquots geteilt und mit Ethanol gefällt. Die trockene Einzelstrang-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt. Ihre Konzentration wurde durch Absorptionsmessung bei 260nm bestimmt ($A_{260nm}=1= 40 \mu\text{g/ml DNA}$).

OLIGONUKLEOTID -- REINIGUNG

Das Oligonukleotid wurde durch Gelelektrophorese auf einen 12%igen denaturierenden Polyacrylamidgel (8M Harnstoff) gereinigt. Als Auftragspuffer dienten 80% Formamid, Farbstoffe und Glycerin. Der Lauf des 0.75mm dicken Gels erfolgte bei 500V. Nach der Elektrophorese wurde das Gel von der Glasplatte auf eine Cellophanfolie übertragen. Darunter wurde eine Kieselgel-Dünnschichtchromatographie Platte gelegt, die mit einem bei 254nm absorbierenden Fluoreszenzfarbstoff beschichtet war, und das Gel von oben mit UV-Licht der Wellenlänge 254nm bestrahlt. Die Stelle im Gel, an der sich eine absorbierende Substanz z.B. Oligonukleotid befand, erschien dunkel im fluoreszierenden Hintergrund.

Die gewünschte Bande (die höchste gut sichtbare) wurde aus dem Gel ausgeschnitten, das Gelstückchen in 500 μl TE mit 0.1% SDS aufgenommen und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde es für 10min abzentrifugiert, mit 150 μl TE nochmals gewaschen und die vereinigten Überstände mit 96% Ethanol, 1/10 Volumen 3M NaAcetat und 10mM MgCl_2 in -70°C für mehrere Stunden gestellt. Das Oligonukleotid wurde dann 20min bei 18000 Upm bei 4°C abzentrifugiert, in Ethanol und Salze

(0.3M NaAcetat, 10mM MgCl₂) aufgenommen und wieder zentrifugiert. Schließlich wurde das Oligonukleotid lyophilisiert, getrocknet und seine Konzentration in TE bei 260nm bestimmt.

OLIGONUKLEOTID-PHOSPHORYLIERUNG

20pmol bzw. 100pmol vom Oligonukleotid wurden mit 20µCi γ -³²P-ATP bzw. 10mM ATP und 20u Polynukleotidkinase bei 37°C für 30min inkubiert (50mM Tris pH 9.5, 10mM MgCl₂, 5mM DTT und 5% Glycerin). Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf 65°C für 10min erhitzt. Wenn das Oligonukleotid radioaktiv markiert wurde, dann war es nötig, den nicht eingebauten γ -³²P-ATP durch eine Chromatographie über eine Sephadex G50-Säule mit 50mM Ammoniumbicarbonat (pH 7.8) abzutrennen.

OLIGONUKLEOTID-ANNEALING UND AUFFÜLLEN

Zu 1pmol von der Einzelstrang-DNA wurden 10pmol Oligonukleotid zugegeben und mit 1 µl von Lösung A (0.2M Tris pH 7.5, 0.1M MgCl₂, 0.5M NaCl, 0.01M DTT) zum Annealing eingestellt. Die Reaktion erfolgte bei 60°C für 5min und anschließend wurde der Ansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Zum Auffüllen wurden zu dem "Annealing"-Ansatz, die benötigten Enzyme, T4-Ligase und Klenow-Polymerase, und die Desoxynukleotidtriphosphate zugegeben. Die geeigneten Reaktionsbedingungen wurden durch Zugabe von 10 µl Lösung B eingestellt : 20mM Tris pH8.8, 15mM MgCl₂, 10mM DTT, je 1mM dNTPs, 1mM ATP. Der Ansatz wurde erst 5min bei 23°C und dann 12h bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde er langsam auf 4°C abgekühlt und mit 0.3M Natriumacetat und 96% Ethanol ausgefällt. Die DNA wurde in 50 µl H₂O aufgenommen und 1 µl davon wurde zur Transformation benötigt.

KOLONIEHYBRIDISIERUNG

Um die positiven Klone nach der Transformation zu isolieren, wurde die Koloniehybridisierung nach Gergen et al. (1979) verwendet. Dabei wurden die erhaltenen Klone auf einer sogenannten "Master-Platte" in einem Raster angeordnet. Auf die Agar Platte wurde ein genau passender Whatman 540 Filter aufgelegt und vorsichtig wieder abgezogen.

Der Filter mit den Kolonien wurde mit der Oberseite für 5min in 0.5N NaOH gelegt. Danach wurde er für 5min mit 0.5M Tris neutralisiert, 5min in 2xSSC gelegt und anschließend mit 96% Ethanol gewaschen und für 30min an der Luft getrocknet.

Der nun fertige Filter wurde für einige Minuten in Vorhybridisierungslösung gelegt, dann in einem Plastikbeutel mit 4 ml Hybridisierungslösung versiegelt und für 2h bei $T_a = 5^\circ\text{C}$ ($=51^\circ\text{C}$) hybridisiert. Die Schmelztemperatur ergibt sich aus der Summe der für A-T- 2°C und C-G- 4°C geltenden Temperaturen.

Die Vorhybridisierungslösung bestand aus 6xNET, 10xDenhardt's, 0.1% SDS und bei der Hybridisierungslösung war zusätzlich das 5'-markierte Oligonukleotid enthalten, das von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP befreit worden war.

Nach der Hybridisierung wurde das Filter dreimal für 5min bei $30-40^\circ\text{C}$ unter der Hybridisierungstemperatur mit 6xSSC und anschließend für 30min bei 10°C unter der Schmelztemperatur (46°C) gewaschen.

Schließlich wurde es an der Luft getrocknet und zur Autoradiographie verwendet.

NET: 1.5M NaCl

150mM Tris-HCl pH8.3

10mM EDTA

Dehnhardt's: 2% Rinderserumalbumin

2% PVP-40 (Polyvinylpyrrolidon)

2% Ficoll

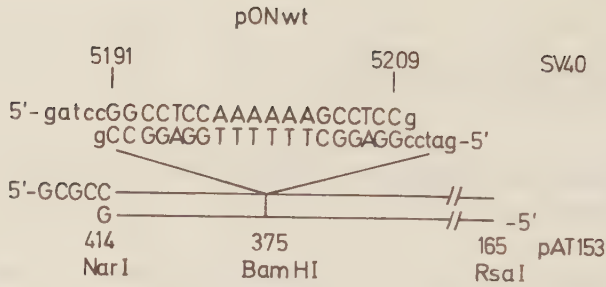
IV. ERGEBNISSE

KONSTRUKTION EINER DNA-BINDUNGSSTELLE MIT HOHER AFFINITÄT FÜR DAS T-ANTIGEN

Das SV40-T-Antigen bindet, wie Tjian (1978) und Tegtmeyer et al. (1983) gezeigt haben, hauptsächlich an zwei Bindungsstellen auf der viralen DNA. Das Protein besitzt die höhere Affinität für die Bindung mit der Bindungsstelle I. Die Untersuchungen von Tegtmeyer et al. (1983) haben auch erkennen lassen, daß zwei der drei Erkennungspentanukleotide für die hohe Bindungsaffinität dieser Bindungsregion verantwortlich sind. Da die Annahme nahe lag, daß eine DNA-Sequenz, die diese Pentamere in der Anordnung von Bindungsstelle I enthält, die starke Bindung hervorruft, wurde von S. Sperka, (Diplomarbeit, 1984) eine 25 Basenpaare (bp) enthaltende DNA-Sequenz synthetisiert. Diese Sequenz entspricht der viralen Sequenz zwischen Nukleotid 5191 und 5209 (Abb. 3) und ist Teil der Bindungsstelle I. Das synthetische Oligonukleotid -versehen mit BamHI Linkern- wurde in die BamHI-Stelle von pAT153 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde pONwt genannt, wobei ON für das synthetische Oligonukleotid steht.

CHARAKTERISIERUNG VON pONwt

Um sicher zu sein, daß es sich um die korrekte Sequenz in dem klonierten Plasmid handelte, wurde die DNA nach der Dideoxy-Methode sequenziert (Abb. 3). Dazu wurde ein Primer benutzt, der die Sequenz der BamHI-Stelle mit flankierenden Nukleotiden des pAT153-Genoms enthält: 5'- TGGAGCCACTAT -3'.



A C G T

**Abb.3 Chemisch-synthetisierte-Oligonukleotid
Bindungsstelle für T-Antigen**

Ein 19bp-synthetisiertes Oligonukleotid, das die Sequenz von T-Antigen BSI (NT 5191-5209, BBB Numerierung nach Tooze, 1981) enthielt, wurde in die BamHI-Stelle von pAT153 (NT 375) kloniert.

Die Sequenz wurde durch Dideoxy-Sequenzierung bestimmt; als Primer diente ein 12 Nukleotid langes synthetisiertes Oligonukleotid komplementär zur BamHI-Stelle von pAT153 (von P. Heinrich).

BINDUNGSVERHALTEN VON pONwt

Um die erwartete Bindungsaffinität des synthetischen Oligonukleotids zu überprüfen, wurde nach der Immunpräzipitation des T-Antigens ein Bindungstest durchgeführt. Dabei wurde die Plasmid DNA mit EcoRI und SalI geschnitten und am 5'-Ende mit Polynukleotid-Kinase radioaktiv markiert. Die Immunpräzipitation wurde mit T-Antigen aus COS1-Zell-extrakten, mit dem monoklonalen Antikörper Pab 108 und fixiertem Staphylococcus aureus durchgeführt. Das T-Antigen von COS1-Zellen entspricht dem Wildtyp-Protein und wird in diesen Zellen konstitutiv synthetisiert. Der monoklonale Antikörper Pab 108 bindet am N-terminalen Ende des T-Antigens und behindert, wie spätere Untersuchungen zeigen, nicht die Bindung an DNA.

Das 678bp EcoRI/SalI Fragment, das die BamHI-Stelle mit dem eingebauten synthetischen Oligonukleotid enthält, wurde spezifisch von dem T-Antigen gebunden (Abb.4). In Abwesenheit des spezifischen Antikörpers war kein gebundenes DNA-Fragment sichtbar.

Die Bindung des T-Antigens an die intakten Kontrollregion des SV40 Genoms wurde parallel dazu untersucht. Das Hind III-C-Fragment von pSVwt wurde spezifisch von dem T-Antigen gebunden.

Das Bindungsverhalten von T-Antigen an pONwt war vergleichbar mit dem an die SV40 Kontrollregion. Setzte man in den Bindungstest gleichzeitig beide DNAs in gleicher Menge ein, so band das T-Antigen an beide DNAs. Die Menge der gebundenen DNA reduzierte sich jeweils auf die Hälfte verglichen mit den einzelnen Bindungstests.

Dies zeigt, daß die synthetische Sequenz von pONwt um das T-Antigen mit der Kontrollregion von SV40 effektiv kompetieren kann.

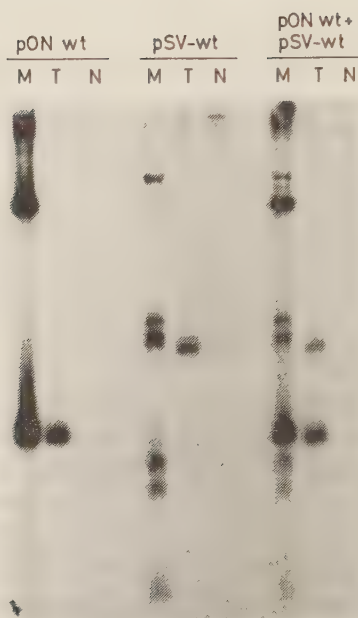


Abb.4 Bindungstest von T-Antigen an viraler DNA (pSVwt) und chemisch-synthetisierten-Oligonukleotid Bindungsstellen (pONwt)

COS1-T-Antigen wurde, wie in dem Kapitel "Methoden" beschrieben, mit Pab 108 IgG (T) bzw. unspezifischen Maus IgG (N) immunpräzipitiert und auf Bindung an 0.25 µg von 5'-end markierten HindIII-Fragmenten von pSVwt oder EcoRI/SalI-Fragmenten von pONwt oder 0.25 µg einer Mischung beider DNAs getestet. Die gebundene DNA wurde von den Immunkomplexen eluiert, auf 2%igen Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie charakterisiert. Als Marker (M) wurden 12.5 ng der eingesetzten DNA aufgetragen.

MODIFIZIERUNG DER FOOTPRINT ANALYSE MIT ROHEN PROTEINEXTRAKTEN

Die Footprintmethode, entwickelt von Galas und Schmitz (1978), beruht auf dem Prinzip, daß DNA-Regionen, an die ein Protein gebunden ist, vor DNAase Aktivität geschützt sind. Dabei wurden in bisher durchgeführten Versuchen gereinigte Proteine mit der DNA inkubiert und getestet.

In dieser Arbeit wurde die Footprint-Methode so modifiziert, daß von einem rohen Proteinextrakt ausgegangen wurde, das bindende Protein durch einen spezifischen Antikörper gefällt und in dieser Form -als Immunkomplex- eingesetzt wurde.

Ziel der nachfolgenden Versuche war es, die Anordnung des gebundenen T-Antigens an die oben beschriebene synthetische DNA (pONwt) mit dieser modifizierten Methode zu untersuchen. Dazu wurde folgendes Arbeitsschema benutzt: Die Plasmid-DNA (pONwt) wurde mit den Enzymen NarI und RsaI so verdaut, daß die synthetische Sequenz in einem 274bp langen Fragment vorlag (Abb.3). Die DNA wurde dann mit Klenow-Polymerase an einem Ende radioaktiv markiert (RsaI produziert glatte Enden, die vom Enzym nicht markiert werden), und das Fragment isoliert. Das T-Antigen aus dem Zellextrakt wurde in Form eines Immunkomplexes mit monoklonalem Antikörper und *Staphylococcus aureus* in die Reaktion gesetzt.

Als erstes wurde die modifizierte Footprint-Methode mit einem Proteinextrakt aus lytisch infizierten Zellen verglichen mit einem Footprint-Experiment mit gereinigtem T-Antigen (von B. Lewton im Labor von Dr. Tegtmeyer). Verwendet wurde der Extrakt von CV-1 Zellen 48h nach einer Infektion mit SV40.

Abb.5 zeigt, daß die geschützte DNA-Region für beide Versuche die gleiche ist; gereinigtes T-Antigen (B) und

T-Antigen aus lytisch infizierten Zellen (A) schützen einen Bereich von etwa 28 Nukleotiden, der die 25 bp synthetische Sequenz enthält. Es werden zusätzlich zu der "CORE" Sequenz, die aus den zwei Pentanukleotiden mit einer dazwischen liegenden 7 bp Sequenz -dem sogenannten Spacer- besteht, an jeder Seite jeweils 5 bis 7 weitere Nukleotide geschützt.

Da in der Footprint-Analyse mit Proteinextrakten mehrere Komponenten in den Testansatz eingeführt wurden, war es notwendig, ihren Einfluß auf das Footprinting aufzuklären. Zu diesem Zweck wurden Footprint-Ansätze mit gereinigtem *T*-Antigen und je einer der Komponenten des Immunkomplexes bzw. einer Mischung der Komponenten mit Ansätzen, die das immungefällte *T*-Antigen aus einem Proteinextrakt enthalten, verglichen (Abb.6).

Für diese Untersuchungen wurde der Proteinextrakt von COS1 Zellen verwendet.

Die von *T*-Antigen geschützte DNA-Region war bei allen Ansätzen die gleiche. Dabei spielte es keine Rolle, ob mit gereinigtem *T*-Antigen alleine (e) oder mit *T*-Antigen und monoklonalem Antikörper Pab 108 (d) oder mit *T*-Antigen -Pab 108 -*Staphylococcus aureus* -Komplex (c) inkubiert wurde. Das Schutzmuster war auch identisch für *T*-Antigen-Immunkomplexe aus COS1-Zellextrakten (b). Schließlich beeinflusste auch die Zugabe von Antikörpern allein (f) zu der DNA nicht die Wirkung der DNAase Reaktion. Daraus ergab sich, daß die Anwendung von Proteinextrakten durch die Hilfe von Immunkomplexen in einer Footprint-Analyse möglich ist.

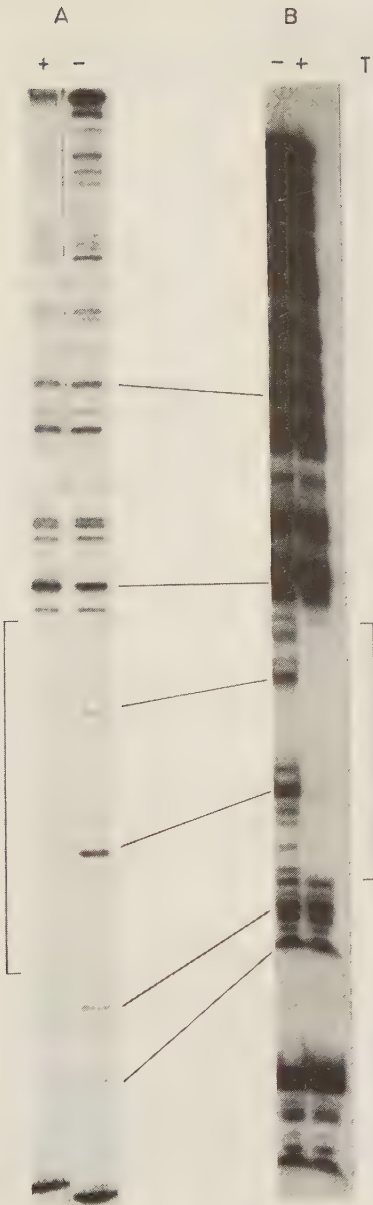


Abb.5 Vergleich des DNAase-Schutzes mit gereinigtem T-Antigen und immunpräzipitiertem T-Antigen aus lytisch infizierten Zellen

Das 3'-end markierte pONwt NarI/RsaI-Fragment wurde mit lytischen T-Antigen Immunkomplexen (A) und gereinigtem lytischem T-Antigen (B) inkubiert. Die DNA allein (-) bzw. die DNA-Protein Komplexe (+) wurden mit 0.01 units DNAaseI inkubiert, auf Sequenzgele aufgetragen und charakterisiert - wie in dem Kapitel "Methoden" beschrieben.

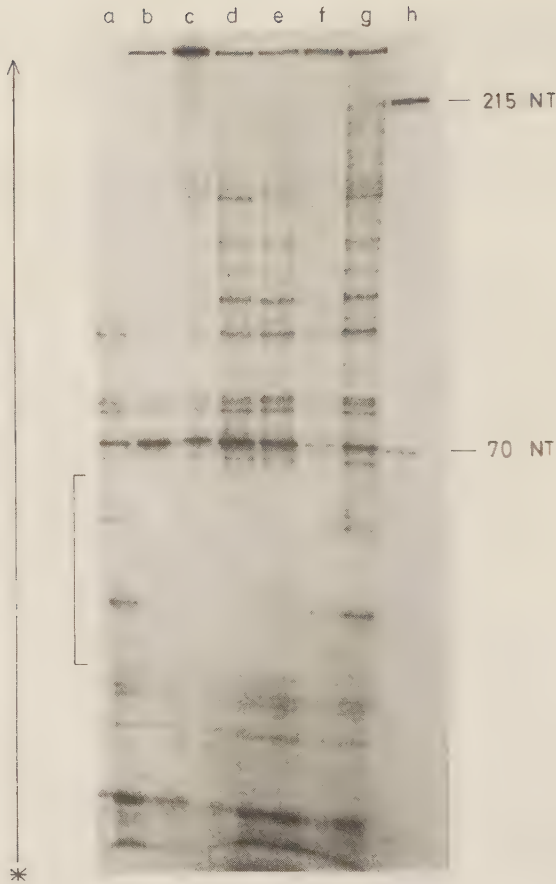


Abb.6 Einfluß der Komponenten für die Immunpräzipitation auf die Footprint Analyse

Das 3'-end markierte *NarI/RsaI* pONwt-Fragment wurde in einer Bindungsreaktion allein (a,g), mit Pab 108 (f), mit gereinigtem T-Antigen allein (e), mit gereinigtem T-Antigen und Pab 108 (d), mit gereinigtem T-Antigen-Pab 108-Staphylococcus aureus-Komplexen (c) und mit Immunkomplexen von T-Antigen aus COS1-Zell-extrakt mit Pab 108 und Staphylococcus aureus inkubiert. Die DNA wurde mit 0.1 units (a,b) oder 0.05 units (c-g) *DNAseI* gespalten und wie in Abb.5 charakterisiert.

KONSTRUKTION VON PLASMIDEN MIT MUTATIONEN IN BINDUNGSSTELLE I

Mit dem Plasmid pONwt erhielten wir eine Bindungsstelle mit starker Bindungsaffinität für das T-Antigen, und es stellte sich nun die Frage, wie sich diese Affinität verändert, wenn man Teile dieser Sequenz modifiziert.

Dazu wurden vier weitere Paare von Oligonukleotiden von R.Mertz synthetisiert.

Diese modifizierten Oligonukleotide enthielten (Abb.7): zwei Basensubstitutionen in einem Pentamer (subPEN), zwei Basensubstitutionen in der Spacer Sequenz zwischen den Pentameren (subSPA), ein umgekehrt orientiertes Pentamer (invPEN) und schließlich

eine Deletion von 3 bp in der Spacer Region (dlSPA).

Die Oligonukleotide wurden auf 12%igen Polyacrylamidgelen gereinigt und 3-10 pmol von zwei komplementären Oligonukleotiden in die BamHI-Stelle von pAT153 kloniert (von U.Markau).

Um festzustellen, ob es sich dabei um die erwarteten Sequenzen handelte, wurden die Plasmide durch Sequenzierung charakterisiert (Abb.8). Die Orientierung des eingebauten Oligonukleotids ergab sich außerdem aus den nachfolgenden Footprint-Analysen.

BINDUNG DES T-ANTIGENS AN MUTANTEN DER BINDUNGSSTELLE I

Die klonierten Sequenzen wurden zuerst auf ihr Bindungsverhalten mit dem modifizierten McKay-Bindungstest (Abb.9) untersucht. Die DNAs wurden mit EcoRI und SalI geschnitten und endmarkiert. Sie wurden dann mit immunkomplexiertem T-Antigen aus COS1 Zellen in 75 mM NaCl-PNE Puffer inkubiert.

MUTATIONAL ANALYSIS OF
SV40 T-ANTIGEN BINDING SITE I

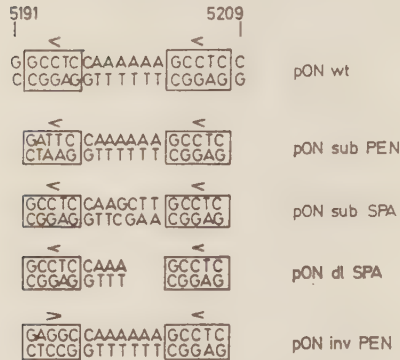


Abb.7 Plasmide zur Bindungsuntersuchungen von Bindungsstelle I

Die Sequenz der wt- und mutierten Bindungsstelle I wird dargestellt. Die Pentanukleotide sind eingerahmt und ihre Orientierung durch Pfeile gekennzeichnet.

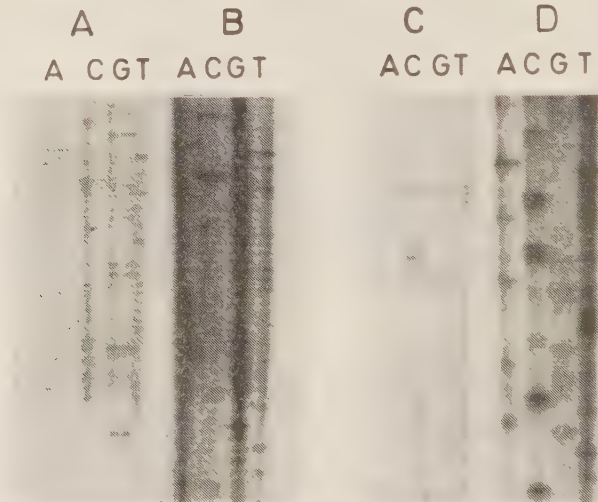


Abb.8 Dideoxy-Sequenzierung von Plasmiden mit Bindungsstelle I

Mit dem in Abb.3 beschriebenen Primer wurde die Sequenz für pONsubPEN (A), subSPA (B), invPEN (C) und dlSPA (D) nach der Dideoxymethode bestimmt.

Es zeigte sich, daß das 678bp EcoRI/SalI Fragment von diesen Plasmiden, das die synthetischen Oligonukleotide enthält, bei allen vier Klonen nicht im Immunkomplex vorkam. Es wurde also keine DNA von T-Antigen gebunden. Im Vergleich dazu hatte das T-Antigen, wie erwartet, eine hohe Affinität für die parallel getestete pONwt DNA. Bei der Kontrolle mit Vektor DNA (pAT153) wurde T-Antigen nicht spezifisch gebunden.

Ähnliche Untersuchungen mit gereinigtem T-Antigen und den Mutanten DNAs in Filter-Binding Assays (durchgeführt von K.Ryder) ergaben für alle Klone eine stark verminderte Bindungsaffinität, verglichen mit der für pONwt.

Die Bindungsexperimente zeigten, daß für die Bindung des T-Antigens alle Elemente der synthetischen Bindungsstelle notwendig sind; sowohl die Sequenz und die Orientierung des Pentanukleotids, als auch die Länge und Sequenz des 7 - bp-Spacers sind für die Bindung wichtig.

FOOTPRINT ANALYSE DER T-ANTIGEN BINDUNG AN DIE MUTIERTE BINDUNGSSTELLE I

Es war weiterhin interessant zu wissen, ob T-Antigen überhaupt an die mutierten DNAs bindet und wie es auf ihnen angeordnet ist.

Die Footprint-Analyse erwies sich dabei als ein empfindliches Testsystem für die Untersuchung der Bindung, da man mit der Immunpräzipitation der Komplexe nur auf gebundene DNA selektioniert.

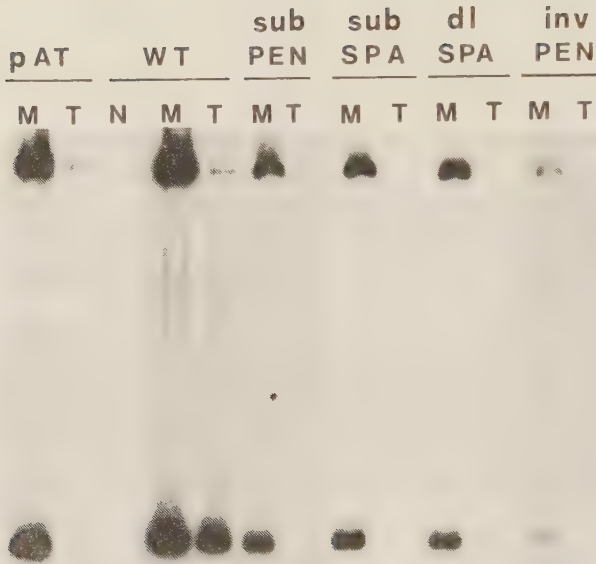


Abb.9 Bindung von COS1-T-Antigen an wt- und mutierte Bindungsstelle I

Das 5'endmarkierte EcoRI/Sall-Fragment von den pON-Plasmiden und von pAT153 wurde mit immunpräzipitiertem COS1-T-Antigen in 75 mM NaCl-PNE Puffer, pH 7.8, inkubiert. Die gebundene DNA wurde von den Immunkomplexen eluiert und nach Elektrophorese auf 2%igen Agarose-Gelen durch Autoradiographie charakterisiert. Eine Kontrolle (N) wurde mit Maus-IgG durchgeführt. Als Marker (M) wurden jeweils 12.5 ng der eingesetzten DNA aufgetragen.

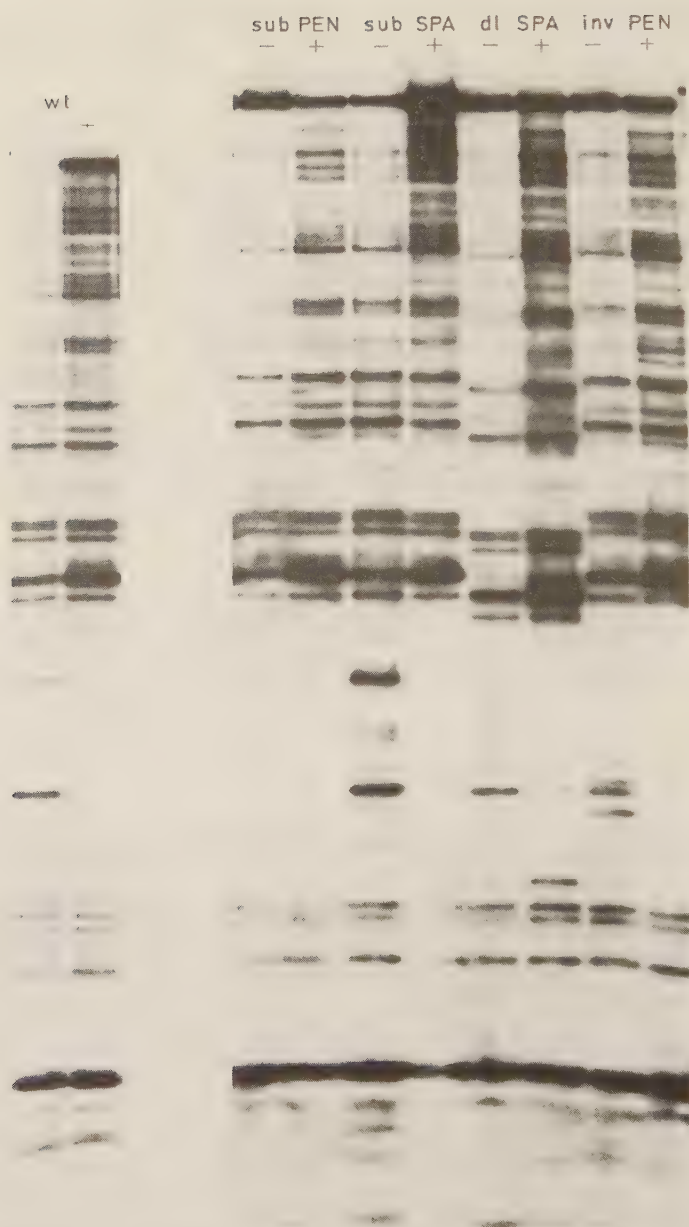
Wie schon für pONwt beschrieben, wurden markierte NarI/RsaI DNA-Fragmente von den Mutanten mit T-Antigen aus COS1-Extrakt in Footprint-Tests eingesetzt.

Das Schutzmuster bei allen Klonen war vergleichbar. Abb.10 zeigt, daß wiederum ca. 28 bp (für pONdlSPA 3 bp weniger) von T-Antigen geschützt werden. Auffallend war, daß der DNAase-Schutz der mutierten DNAs dem des Wildtyps glich. Dies bedeutet, daß das T-Antigen, obwohl es für alle Klone eine geringe Affinität aufweist, sich auf der DNA in ähnlicher Weise anordnet.

K.Ryder hat weiterhin mit den mutierten DNAs Methylierungs-Schutz Analysen und Alkylierungs-Interferenz Experimente durchgeführt (Ryder et al., 1985). Er konnte dadurch bestätigen, daß trotz der veränderten Sequenz T-Antigen Moleküle an diese DNAs binden, jedoch mit geringerer Affinität.

Abb.10 DNAase Footprint Analyse der Bindung von T-Antigen an pON-DNAs

Das 3'endmarkierte NarI/RsaI-Fragment von jedem pON-Plasmid wurde isoliert und allein (-) bzw. mit immunkomplexiertem COS1-T-Antigen (+) inkubiert. Die DNA wurde dann mit 0.5 units DNAaseI abgebaut und wie schon in Abb.5 beschrieben weiterbehandelt. -s.Seite 44



KONSTRUKTION EINER MUTANTE MIT 1 bp-DELETION IN DER SPACER REGION VON BINDUNGSSTELLE I

Die schon beschriebene Footprint-Analyse des pONwt und der verwandten Mutanten, sowie die erwähnten DMS-Schutz- und Alkylierungs-Interferenz-Untersuchungen haben gezeigt, daß für die Bindung des T-Antigens an die Bindungsstelle I drei Elemente wichtig waren: die zwei Pentamere und die Spacer-Region.

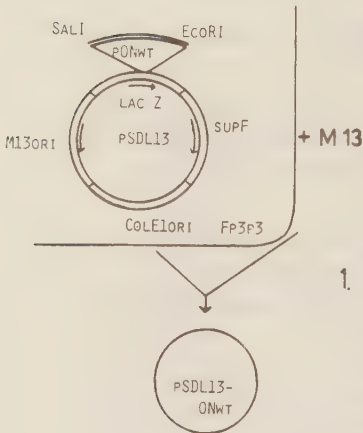
Für diese Spacer-Region vermutete man eine Funktion bei der Anordnung der einzelnen T-Antigen Monomere auf der Bindungsstelle und bei der darauffolgenden Wechselwirkung zwischen den Monomeren. Durch die Alkylierungsinterferenz-Experimente konnten direkte Interaktionen mit dieser Sequenz nicht ausgeschlossen werden, aber die Besonderheit dieser Sequenz wies eher auf eine mögliche Konformationsänderung der DNA hin.

Wir waren deshalb daran interessiert, außer den zwei Plasmiden pONsubSPA und pONdlSPA, bei denen größere Teile der Sequenz verändert oder deletiert sind, eine weitere Mutante zu konstruieren, bei der nur eines der AT-Basenpaare fehlt.

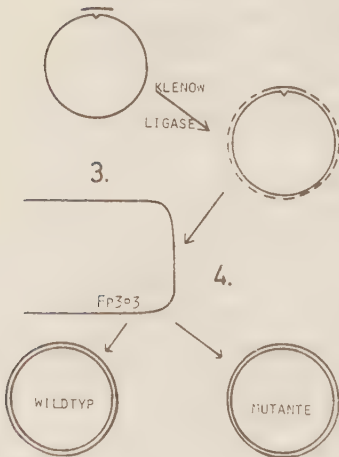
Zur Konstruktion der Mutante wurde ein anderer Weg eingeschlagen: die durch Oligonukleotide gesteuerte Mutagenese. Bei dieser Methode war nur ein Strang des synthetischen Oligonukleotids notwendig. Die Besonderheit hier bestand in der Einführung einer Deletion statt der üblichen Anwendung der Methode zur Einführung von Substitutionen (Itakura et al., 1984).

OLIGONUKLEOTID-GESTEUERTE MUTAGENESE

Die Mutagenese erfolgte nach folgendem Schema:



+ 5'-GGCCTCCAAAAAGCCTCC-3'



1. Konstruktion eines einzelsträngigen Templates mit wt-Sequenzen

Das **EcoRI/SalI**-Fragment von **pONwt** wurde isoliert und in den Polylinker von **pSDL13** kloniert.

Durch Infektion von **Fp3p3** Zellen mit **M13**, die das **pSDL13**-Derivat enthielten, konnten einzelsträngige Templates isoliert werden.

2. Synthese eines Oligonukleotids, das ein A/T-Paar weniger als der Wildtyp enthält.

Das Oligonukleotid wurde aus einem 12xigen denaturierenden

3. Polyacrylamidgel isoliert und anschließend phosphoryliert.

4. Annealing und Auffüllen zur doppelsträngigen DNA.

Nach Zugabe von 10pmol Oligonukleotid zu 1pmol Template bei 60°C paarte sich das synthetische Oligonukleotid mit dem Wildtyp-Template. Man füllte dies dann mit dNTPs und Enzymen (Ligase und Klenow-Polymerase) bei 14°C zu einer doppelsträngigen DNA auf.

5. Transformation mit der ds-DNA

Diese doppelsträngige DNA (1/50) wurde zur Transformation kompetenter **Fp3p3** Bakterien verwendet. Nach der DNA Replikation erhielt man außer **wt**-Klonen, auch solche, die die Deletion trugen.

5. Charakterisierung der Mutante durch Kolonie-hybridisierung und Sequenzierung.

Nach der Transformation erhielt man Ampicillin und Tetracyclin resistente Klone, die durch Kolonie-hybridisierung auf den Einbau von mutierten Oligonukleotid-Sequenzen getestet wurden.

Eine sogenannte "Master"-Platte wurde mit 114 Klone angelegt; als negative Kontrolle wurde ein Klon von pSDL13 aufgetragen. Die Änderung eines Basenpaares führt zu einem "mismatch" zwischen dem Oligonukleotid und der DNA, was allgemein die Schmelztemperatur von Heteroduplices bis zu 10°C erniedrigen kann. Aus diesem Grunde wurden die Bedingungen so gewählt, daß die Hybridisierung bei einer Temperatur, die 5°C unter der Schmelztemperatur des Oligonukleotids lag, erfolgte. Das Waschen wurde bei einer um 5°C geringeren Temperatur durchgeführt, so daß bei diesen stringenten Bedingungen das Oligonukleotid von der wt-DNA abgetrennt wurde.

Weiterhin wurden die positiven Klone auf die erwartete Sequenz hin überprüft. Da der Unterschied von einem Basenpaar zum Wildtyp nicht anders bestimmbar war, wurden einige positive Klone durch Dideoxy-Sequenzierung charakterisiert (Abb.11).

FINDUNG VON T-ANTIGEN AN pONdlSPAA

Der durch die Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese erhaltene Klon, pONdlSPAA, wurde auf sein Bindungsverhalten im Immunpräzipitationstest getestet.

Dazu wurde pONdlSPAA, sowie zwei weitere Klone, die das EcoRI/SalI-Fragment von einerseits pONwt und andererseits pONsubSPA im Polylinker von pSDL13 enthielten, mit EcoRI und SalI geschnitten und am 5'-Ende radioaktiv markiert.

Die Bindungsaffinität des T-Antigens aus COS1-Extrakt, das im Immunkomplex mit Pab 108 (bzw. Maus IgG als Kontrolle) und Staphylococcus aureus vorlag, wurde für die drei

A C G T

A C G T

dl
SPAa

WT



Abb.11 Dideoxy-Sequenzierung von pONdlSPAa-DNAs

Es wird die Sequenzierung eines Klonen dargestellt, der im Vergleich zum WT ein A/T-Paar weniger in der Spacer Region (Pfeil) besitzt (Primer wie Abb.3).

beschriebenen DNAs untersucht.

Abb.12 zeigt, daß das T-Antigen - wie erwartet - an pONwt Sequenzen mit hoher Affinität bindet, während eine Bindung an pONsubSPA Sequenzen nicht vorhanden ist. Dagegen ist die Bindung von pONdlSPAa verglichen mit dem Wildtyp zwar schwächer aber immerhin erkennbar im Unterschied zu subSPA. Dies bedeutet, daß die Deletion eines einzigen Basenpaares aus der Spacer-Region die Affinität des T-Antigens für die Bindungsstelle I vermindert.

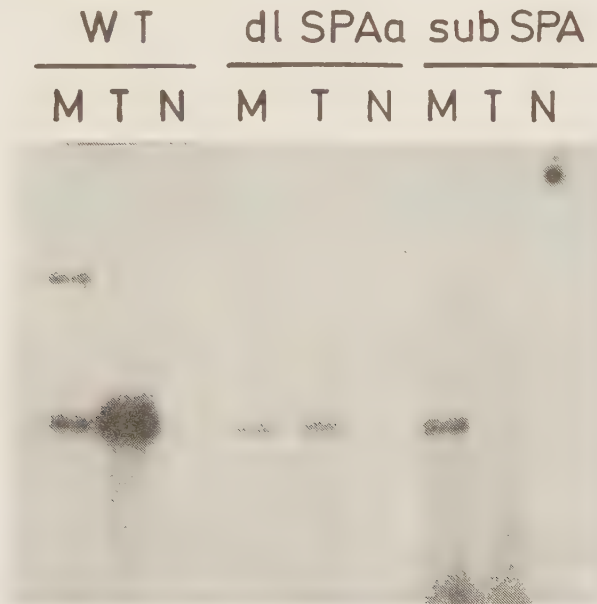


Abb.12 T-Antigen Bindung an pONdlSPAa

Die EcoRI/SalI-Fragmente von pONwt und pONsubSPA, die in pSDL13 kloniert waren, wurden ausgeschnitten und zusammen mit dem entsprechenden Fragment aus pONdlSPAa am 5'Ende radioaktiv markiert. COS1-T-Antigen wurde mit Pab 108 IgG (T) bzw. Maus-IgG (N) immunpräzipitiert und, wie in Abb.4 beschrieben, auf Bindung getestet.

AUSARBEITUNG DES GEL-RETENTION ASSAYS FÜR T-ANTIGEN BINDUNG AN BINDUNGSSTELLE I

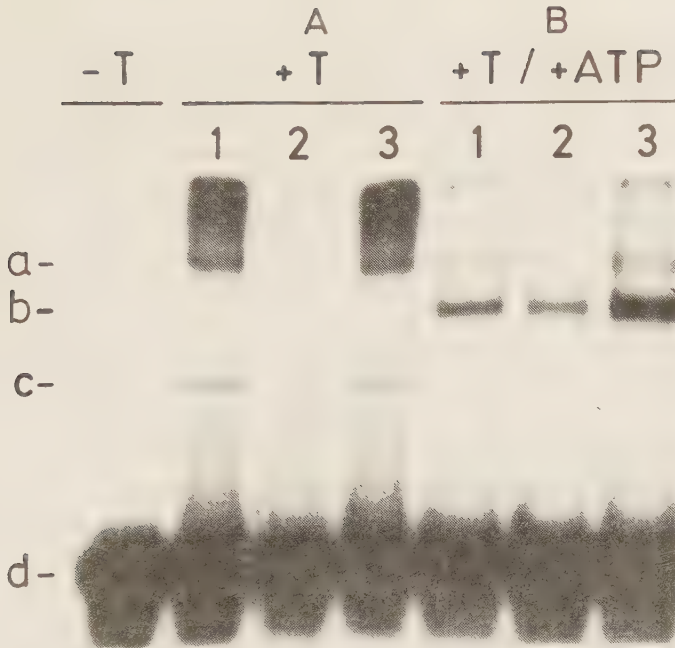
Mit dem DNA-Bindungstest durch Immunpräzipitation und den Filter Binding Assays konnten keine exakten quantitativen Angaben für die unterschiedlichen Affinitäten des T-Antigens an den verschiedenen DNA-Sequenzen der Bindungsstelle I gemacht werden.

Wir haben deshalb eine andere Methode zur Charakterisierung der DNA-Protein Interaktionen verwendet: den Gel-Retention Assay nach Fried and Crothers (1981). Das Prinzip dieses Tests beruht auf der verminderten Laufgeschwindigkeit von DNA-Protein-Komplexen, verglichen mit freier DNA in nativen Polyacrylamidgelen.

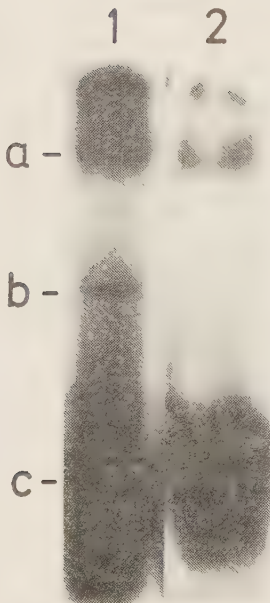
Als erstes stellte sich die Frage, ob der Gel-Retention Assay eine geeignete Methode zur Untersuchung der T-Antigen-Bindungseigenschaften darstellt und wie sich das T-Antigen im Vergleich mit den anderen Tests dabei verhält. Für diesen Test wurde ein radioaktiv markiertes 89bp langes DNA Fragment (NaeI/TaqI) von pONwt verwendet, das vorher aus einem Polyacrylamidgel isoliert wurde. Dieses Fragment, das die Bindungsstelle I für T-Antigen enthält, wurde mit COS1-Extrakt inkubiert und anschließend auf ein 6%-iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen.

Da im Proteinextrakt außer dem T-Antigen auch sämtliche Zellproteine enthalten sind, die die spezifische Bindung stören, wurde zu jedem Ansatz 1-2 µg beschallte E.coli DNA zugegeben.

Um die in der Autoradiographie erscheinenden Banden als spezifisch charakterisieren zu können, wurde die Bindung mit kalter spezifischer bzw. unspezifischer DNA kompetiert. Als Kompetitor DNA wurde das gesamte pONwt- bzw. pAT153-Plasmid, das vorher ebenfalls mit NaeI und TaqI gespalten wurde, verwendet.



**Abb.13 Gel Retention Assay
mit pONwt-DNA und
COSI-T-Antigen**



A : Das 5'-endmarkierte pONwt NaeI/TaqI-Fragment wurde ohne (-T) oder mit (+T) COSI-Extrakt inkubiert. Die Bindung wurde mit 0.75 µg pONwt- (2) oder 0.75 µg pAT153-DNA (3) kompetiert. Die Plasmid-DNA war mit NaeI/TaqI gespalten.

B : Der Extrakt wurde vor der Inkubation mit der DNA (wie A) 30min mit 10mM ATP vorinkubiert.

C : (1): gleicher Ansatz wie bei 13A-1

(2): Inkubation zusätzlich mit 10mM MgCl₂

Die gesamten Ansätze wurden auf 6%ige Polyacrylamidgele aufgetrennt, die Gele getrocknet, und durch Autoradiographie charakterisiert.

Abb.13, A Spur 1 zeigt zwei Banden (a und c), die nach der Inkubation der DNA mit T-Antigen aus COS1-Extrakt entstanden. Der größte Teil der DNA bleibt ungebunden (d). Durch die Zugabe von spezifischer unmarkierter pONwt DNA (Abb.13, A Spur2) in einem 30fachen Überschuß wird die Bindung des Proteins an die DNA kompetiert. Dabei verschwinden beide Protein-DNA-Komplex-Banden, die dagegen mit unspezifischer DNA, ebenfalls im 30fachen Überschuß, erhalten bleiben (Spur 3).

Die bereits beschriebenen Untersuchungen mit Bindungsstelle I (Ryder et al., 1985) stützen die Annahme, daß die Bande (a) dem Komplex von T-Antigen-Dimeren mit der DNA entspricht, während (c) ein Monomer-DNA-Komplex ist.

Die Möglichkeit von weiteren Anwendungen dieses Tests zur Charakterisierung anderer T-Antigen-DNA Bindungseigenschaften wurde ebenfalls untersucht.

B.Vogt et al. (1986) haben gezeigt, daß die Bindung von immunpräzipitiertem SV40-T-Antigen an die DNA durch Zugabe von ATP inhibiert wurde. Um auszuschließen, daß dabei Komponenten des Immunpräzipitationstests interferieren, wurde das Vorkommen dieser Inhibition auch mit dem Gel-Retention Assay untersucht.

Dazu wurde der Test bei den gleichen Bedingungen wie beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, daß eine halbe Stunde vor Inkubation mit dem pONwt-DNA Fragment 10mM ATP zum COS1-Extrakt zugegeben wurde. Die Spezifität der Bindung wurde auch hier durch die Zugabe spezifischer (Abb.13 B, Spur 2) und unspezifischer (Spur 3) Plasmid-DNA kontrolliert.

Abb.13 B (Spur 1) zeigt, daß nach Zugabe von ATP die Bande (c) fast vollständig verschwindet, während Bande (a) viel schwächer als in A erscheint. Die Zugabe von spezifischer DNA (Spur 2) kompetiert die schon schwache Bildung der

Komplexe der DNA mit T-Antigen (a) und (c); dagegen bleibt die Intensität dieser Banden gleich bei der Konkurrenz mit unspezifischer DNA (Spur 3).

In Gegenwart von ATP erscheint eine weitere Bande (b), die aber von spezifischer und unspezifischer DNA nicht kompetiert wird. Für diesen Komplex eines "ATP-abhängigen Proteins" mit dem 89bp Fragment von pONwt gibt es bisher keine Erklärung.

Durch dieses Experiment wurde also gezeigt, daß die Zugabe von 10mM ATP die Bindung des T-Antigens an der Bindungsstelle I inhibiert.

Die Bindung des T-Antigens an die Bindungsstelle I wird, wie Abb.13C zeigt, auch von 10 mM $MgCl_2$ abgeschwächt; dies entspricht einem 10fachen molaren Überschuß zu EDTA im Ansatz. Die Inhibition der Bindung durch divalente Kationen wurde auch mit dem Immunpräzipitation-Bindungstest nachgewiesen (B.Vogt et al., 1986).

Als weiterer Beweis für die Spezifität der Banden im Gel-Retention Assay für T-Antigen/DNA Komplexe wurde der Test auch mit gereinigtem lytischen T-Antigen durchgeführt (Geschenk von Dr. P.Tegtmeyer). Dazu wurde das gereinigte Protein mit dem pONwt NaeI/TaqI-Fragment für eine Stunde inkubiert (Abb.14). Man erhielt eine langsam laufende Bande, an ähnlicher Stelle wie die schon gefundene Bande (a) in Abb.13. Um auch hiermit die ATP-Inhibition der DNA-Bindung zu testen, wurde eine halbe Stunde vor Inkubation mit der DNA 10mM ATP bzw. dessen Analogon ATP γ S zu dem gereinigten Protein zugegeben. Wie erwartet, verschwand die Bande, die dem T-Antigen-DNA Komplex entsprach. Die Spezifität wurde hier ebenfalls durch Konkurrenz mit spezifischer bzw. unspezifischer DNA geprüft. Dazu wurde unmarkierte pSDL13-wt bzw. pSDL13-Vektor DNA verwendet.

Das Ergebnis entspricht dem mit dem T-Antigen aus

COS1-Extrakten.

Dadurch konnte gezeigt werden, daß Gel-Retention Assays eine geeignete Methode zur Untersuchung von Bindungseigenschaften des T-Antigens darstellen, und daß das T-Antigen sich bei Immunpräzipitation und Gel-Retention Tests ähnlich verhält.

-	-	ATPS	ATP	-	-	NUCLEOTIDE
-	-	-	-	S	NS	COMPETITOR
-	+	+	+	+	+	TAg

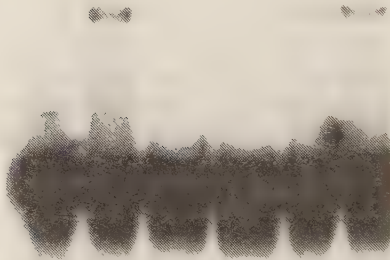


Abb.14 Gel Retention Assay mit gereinigtem T-Antigen

Das 5'-endmarkierte NaeI/TaqI pONwt Fragment wurde ohne (-) und mit (+) gereinigtem T-Antigen inkubiert. Eine halbe Stunde vor Inkubation mit der DNA wurde zu zwei Ansätzen 20mM Nukleotid (+) dazugegeben. Die Bindung wurde durch Zugabe von spezifischer pSDL13-wt DNA (S) oder unspezifischer pSDL13-Vektor DNA (NS) kompetiert.

AFFINITÄTSBESTIMMUNG DES T-ANTIGENS FÜR pONwt UND MUTANTEN DER BINDUNGSSTELLE I

Die Grundüberlegung bei diesen Untersuchungen war, die unterschiedlichen Affinitäten der Mutanten durch Konkurrenz mit unmarkierter homologer DNA zu bestimmen. Dies erwies sich aber auch mit diesem Test als nicht durchführbar, da die Affinität des T-Antigens für die Mutanten-DNA so gering war, daß kein verwertbares Signal auf den nativen Polyacrylamid-Gele erschien.

Aus diesem Grund haben wir einen indirekten Weg eingeschlagen, um die unterschiedlichen Affinitäten zu vergleichen.

Das markierte pONwt NaeI/TaqI Fragment wurde mit COSI-T-Antigen eingesetzt. Die Bindung wurde dann mit kalter pONwt-DNA bzw. Mutanten-DNA kompetiert.

Die Bindung des T-Antigens an das pONwt-Fragment wird von steigenden Mengen unmarkierter pONwt-DNA geschwächt. Dagegen können entsprechende Mengen von Mutanten-DNAs die spezifische Bindung nicht so stark kompetieren. Abb.15A zeigt dies für subSPA und subPEN und Abb.15B für invPEN, dlSPA und dlSPAs. Die Banden, die den Protein-DNA-Komplexen entsprechen, wurden aus dem Gel geschnitten und ihre Aktivität durch Szintillationsmessung bestimmt. In Abb.16 wurde die Menge der unmarkierten DNA gegen die Aktivitätsprozentage des Komplexes aufgetragen; dabei wurde die Aktivität des Komplexes im Ansatz ohne kompetierende DNA als 100% angesetzt. Betrachtet man die Abnahme der Aktivität des Komplexes (a) (Abb.16) bei steigenden Mengen hinzugefügter unmarkierter wt-DNA, dann erfolgt sie viel schneller als bei der Zugabe mutierter DNAs. Bei der höchsten Menge zugegebener DNA wird der Komplex von wt-DNA zu ca.5% kompetiert, während die Mutanten pONsubSPA, subPEN, dlSPA und invPEN die Bindung zu ungefähr 30-40% kompetieren können. Von pONdlSPAs wird, wie erwartet, die Bindung besser

kompetiert. Auffallend ist, daß die Konkurrenz des Komplexes (b) (Abb.16), der wahrscheinlich einen T-Antigen-Monomer DNA Komplex entspricht, bei Zugabe von Wildtyp und Mutanten DNAs ähnlich verläuft. Dies bedeutet, daß bei der Bindung des T-Antigens an Bindungsstelle I Monomere an Teile der Sequenz binden. Diese Bindung erfolgt unabhängig von den benachbarten Sequenzen und resultiert wahrscheinlich aus der hohen Aktivität der Monomer-Formen des T-Antigens (Fanning et al., 1982).

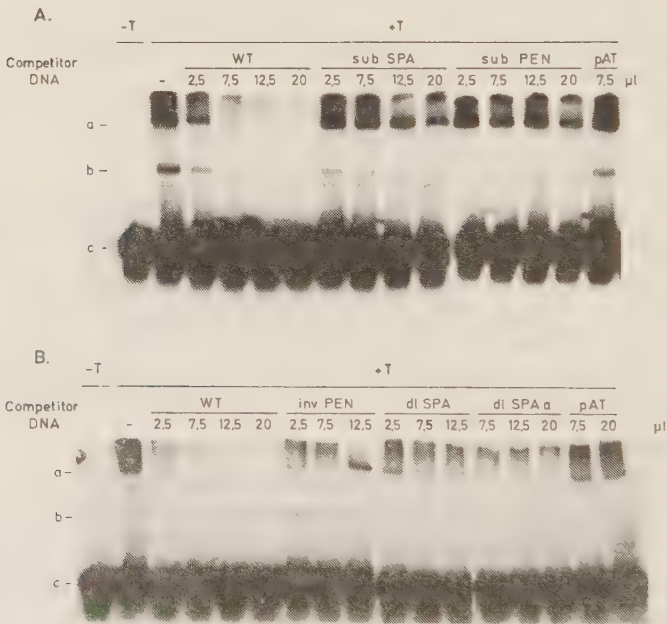


Abb.15 Kompetitionsuntersuchung der Bindung an pONwt-DNA

Das 5'-endmarkierte pONwt-Fragment wurde wie in Abb.13-A inkubiert. Die Bindung wurde mit den angegebenen Mengen der Plasmid-DNAs (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) im Ansatz kompetiert. Die gesamten Ansätze wurden auf 6%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und durch Autoradiographie charakterisiert.

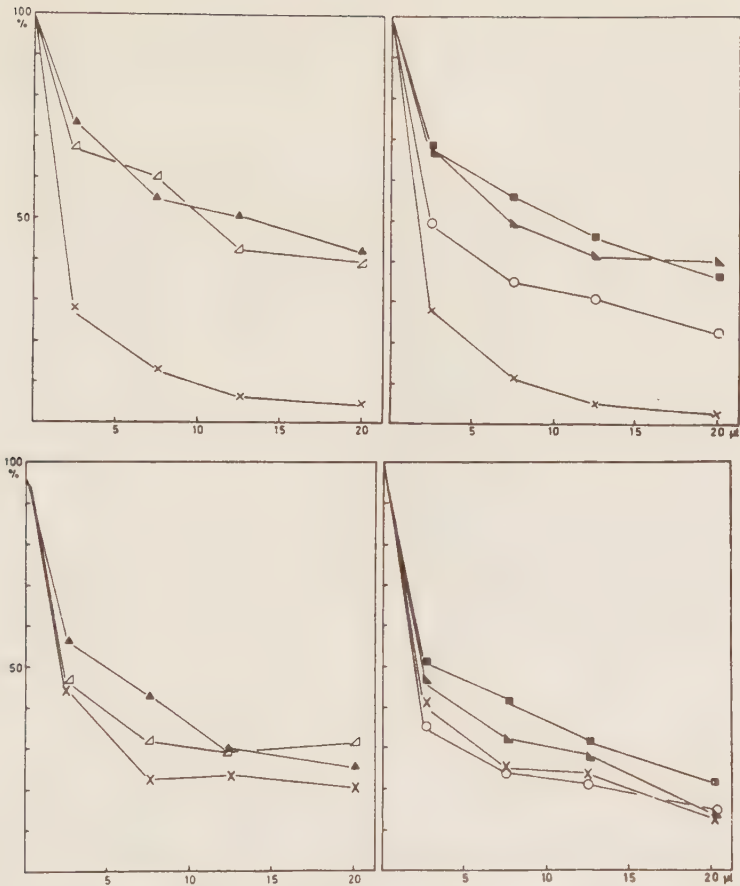


Abb.16 Abhängigkeit der Konkurrenz an der Bindungsstelle I von der Menge der Plasmid-DNAs

Aufgetragen sind die Mengen zugegebener unmarkierter Plasmid DNA (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf der Abszisse und die Prozente der Aktivität der Komplexe auf der Ordinate. Als 100% wurde der Quotient aus cpm des Protein-DNA Komplexes ohne kompetierende DNA zu cpm der Komplexe mit kompetierender DNA festgesetzt.

(a): Dimer-DNA-Komplex; (b): Monomer-DNA-Komplex

(X): pONwt

(Δ): pONsubSPA

(▲): pONsubPEN

(▴): pONinvPEN

(■): pONdlSPA

(○): pONdlSPAa

PLASMIDE MIT MEHREREN KOPIEN DER MUTIERTEN BINDUNGSSTELLE I

CHARAKTERISIERUNG

Bei der Konstruktion der vier Mutanten pONsubSPA, -dlSPA, -subPEN und -invPEN erhielt man auch Klone, die längere eingebaute Sequenzen besaßen. Zwei von ihnen wurden weiter charakterisiert. Das DNAase-Abbau Muster, sowie die Sequenzierung mit der Dideoxymethode ergaben, daß es sich dabei um die dreifache Kopie des Oligonukleotids von dlSPA und um die zweifache Kopie des Oligonukleotids von subPEN handelte (Abb.17).

Der subPEN 2 Klon enthält zwei Kopien des Oligonukleotids in umgekehrter Orientierung wie Wildtyp. Zwischen den Kopien liegt der BamHI-Linker und es ergibt sich die in Abb.17 (A) dargestellte Reihenfolge der Pentanukleotide.

Die dlSPA-Oligonukleotid-Kopien sind in unterschiedlichen Orientierungen eingebaut - zwei von ihnen in umgekehrter Richtung verglichen mit wt und die dritte wie wt. Es ergibt sich daraus eine Anordnung von Pentameren, die in Abb.17 (B) dargestellt wird.

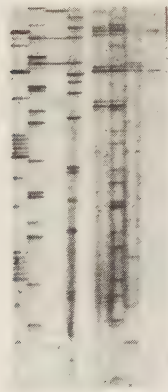
BINDUNG VON T-ANTIGEN AN pONdlSPA 3 UND pONsubPEN 2

Als erstes wurden die Bindungseigenschaften dieser Klone untersucht. Dazu wurde wiederum ein Immunpräzipitationstest mit monoklonalen Antikörper Pab 108 und Staphylococcus aureus verwendet. Die Plasmid DNA wurde, wie auch in der schon beschriebenen Mutanten-Analyse, mit EcoRI und SalI gespalten und radioaktiv markiert.

Die Immunpräzipitation und Bindung an die DNA wurde unter zwei verschiedenen Pufferbedingungen (in 75mM NaCl-PNE pH7.8 und 80mM KCl-Puffer A pH7.8) mit dem gleichen Ergebnis (Abb.18) durchgeführt. Die DNA der Plasmide wurde spezifisch vom T-Antigen gebunden. Die Bindung war jedoch schwächer als bei pONwt. Dagegen war die Bindungsaffinität höher als bei den entsprechenden Mutanten pONdlSPA und pONsubPEN, die eine

Einzelkopie des synthetischen Oligonukleotids enthalten.

A B
ACGT ACGT



A: 5'-GATCCGATTC[←]CAAAAAA[←]GCCTC[←]CGGATCCGATTC[←]CAAAAAA[←]GCCTC[←]CG-3'

B: 5'-GATCCG[←]GCCTC[←]CAAAA[←]GCCTC[←]CGGATCCG[←]GCCTC[←]CAAAA[←]GCCTC[←]CGGATCCG[←]GAGGC[←]TTTG[←]GAGGC[←]CG-3'

Abb.17 Dideoxy-Sequenzierung der Plasmide mit mehreren Kopien der Bindungsstelle I

Die Sequenzierung erfolgte wie für pONwt schon beschrieben.

A : Sequenz von pONsubPEN 2

B : Sequenz von pONdlSPA 3

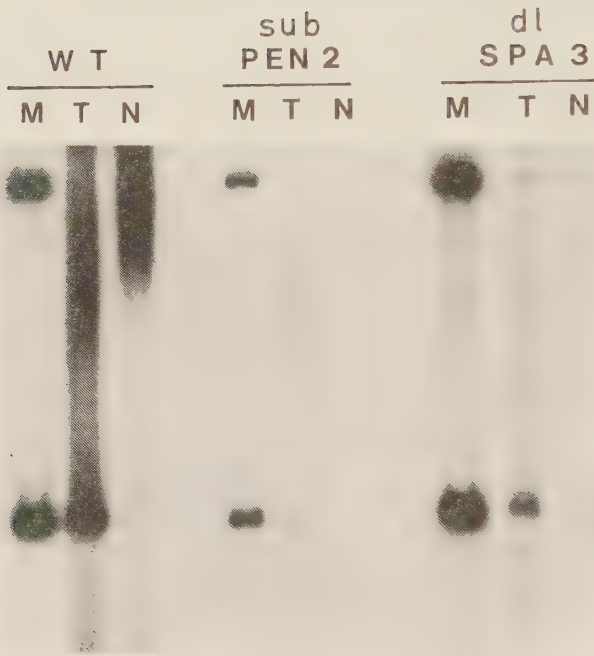


Abb.18 Bindung von T-Antigen an pONsubPEN 2 und pONdlSPA 3

Immunpräzipitiertes COS1-T-Antigen wurde auf Bindung an EcoRI/SalI Fragmenten von pONwt, pONsubPEN 2 und pONdlSPA 3 untersucht (wie Abb.4)

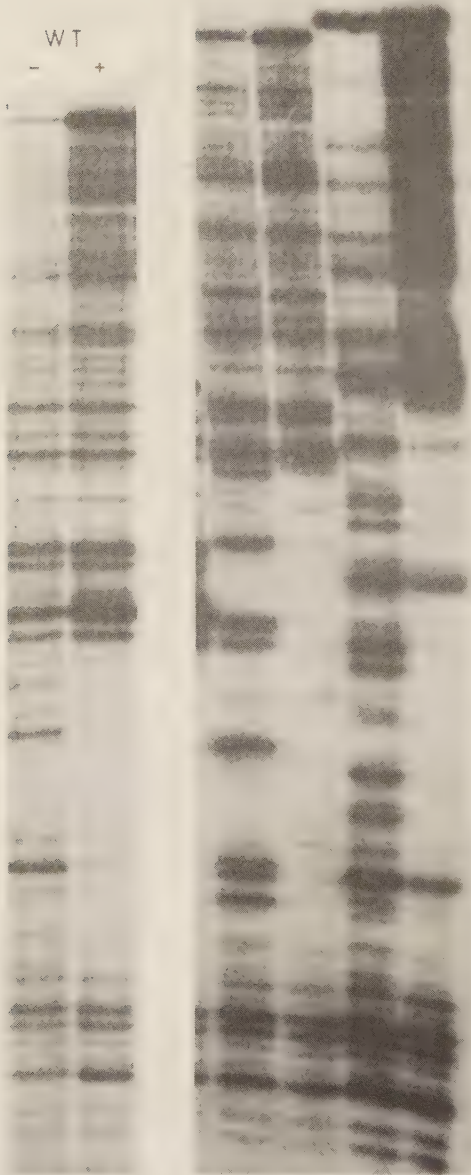
Interessant war weiterhin zu untersuchen, wie das T-Antigen auf diesen mutierten DNAs angeordnet ist. Dazu wurden Footprint-Analysen mit dem schon beschriebenen *NarI/RsaI* Fragment und COS1-Extrakt durchgeführt.

Die DNA wurde -ähnlich wie bei den anderen Mutanten- über den gesamten Bereich der synthetischen Region geschützt. Wie Abb.19 zeigt, erstreckt sich der Schutz hier über die 28 Nukleotide (3bp weniger für dlSPA) der Einzelkopie-Mutanten hinaus. Für sub PEN 2 wurden zusätzlich ca.25 Nukleotide und für dlSPA 3 ca.45 Nukleotide geschützt.

Mit diesen DNAs wurden auch Kompetitionsversuche für die Bindung des T-Antigens an pONwt mit dem Gel-Retention Assay durchgeführt. Anders als bei den restlichen Einzelkopie Mutanten wurde hier, wie Abb.20 zeigt, die Bindung des T-Antigens an pONwt von den zwei- bzw. dreifach-Kopie-Mutanten DNAs stärker kompetiert. Jedoch erscheint die Konkurrenz mit diesen DNAs nicht das Niveau der wt-DNA Konkurrenz zu erreichen, was auch aus der verminderten Bindungsaktivität im Immunpräzipitationstest zu erwarten war.

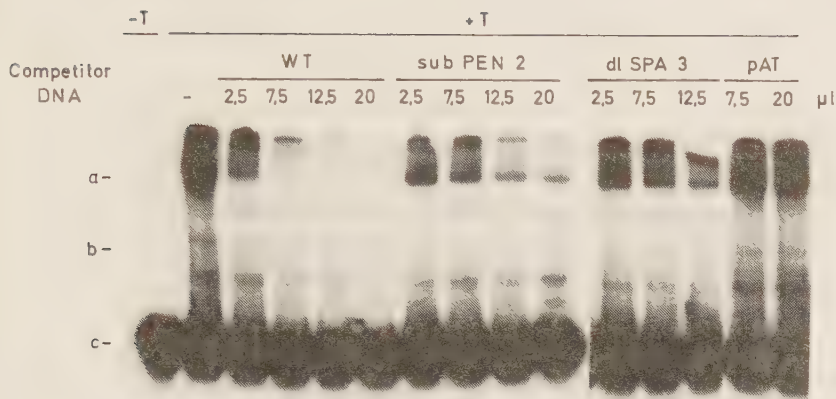
sub PEN 2 dl SPA 3
- + - +

WT
- +



**Abb.19 Footprint Analyse
der COS1-T-Antigen
Bindung an pONwt,
pONsubPEN 2 und
pONdlSPA 3 DNA**

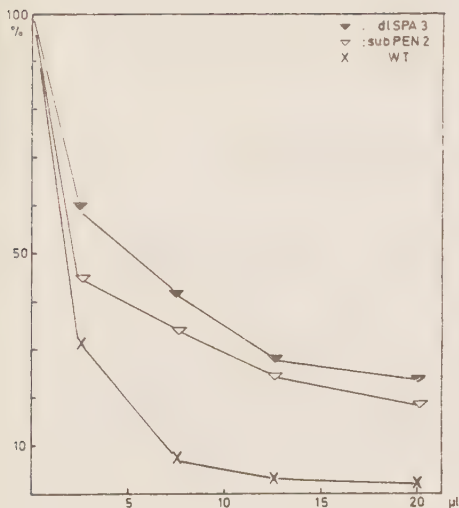
Die *NarI/RsaI* Fragmente von pONwt, pONsubPEN 2 und pONdlSPA 3 wurden ohne (-) und mit (+) immungefälltem COS1-T-Antigen inkubiert und anschließend mit 0.05 u DNAase abgebaut. Die DNA Fragmente wurden auf denaturierenden Sequenzgelen aufgetrennt.



A.

Abb. 20

**Kompetitionsuntersuchung
der Bindung an pONwt
mit pONsubPEN 2 und
pONdlSPA 3**



B.

A. Das endmarkierte NaeI/TaqI Fragment von pONwt wurde mit COSI-Extrakt inkubiert. Zur Konkurrenz wurden die angegebenen Mengen der Plasmid-DNAs, die auch mit NaeI/TaqI gespalten waren und in einer Konzentration von 0.1 µg/µl vorlagen, zugegeben. Die gesamten Ansätze wurden auf einem 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie charakterisiert.

B. Die zugegebenen Mengen kompetierender Plasmid-DNA (0.1 µg/ml) wurden gegen die Aktivitätsprozente der einzelnen Komplexe aufgetragen (wie Abb. 16).

BINDUNG DES T-ANTIGENS AN DIE DNA SV40-VERWANDTER VIREN

Die bisherigen Bindungsexperimente mit den Plasmiden pONsubSPA, dlSPA und dlSPAa, die Veränderungen in der Spacer-Region zwischen den Erkennungspentanukleotiden der Bindungsstelle I haben, zeigten, daß diese Sequenz für die Bindungsaffinität des T-Antigens an der DNA eine Rolle spielt. Weiterhin unterstützten die Untersuchungen mit Plasmiden mit mehrfachen Kopien der veränderten Bindungsstelle I (pONdlSPA 3 und pONsubPEN 2) die Vorstellung, daß das wiederholte Vorkommen der Bindungsstelle unabhängig von Sequenz-Veränderungen die Bindungsaffinität beeinflussen kann. Daher stellte sich die Frage, wie das T-Antigen an andere DNAs bindet, die sich weiter in der Spacer-Region unterscheiden und bei denen die Erkennungssequenzen mehrmals vorkommen.

Zu diesem Zweck wurden die DNAs SV40-verwandter Viren benutzt - zum einen die DNA von Polyoma und zum anderen die DNAs von JC, BK und LPV-Viren.

BINDUNG DES T-ANTIGENS AN POLYOMA SEQUENZEN

Bei dem Polyoma Virus, das mit SV40 viele gemeinsame Eigenschaften teilt, kommt ebenfalls das Pentanukleotid 5'-GAGGC-3' mehrmals in der Kontrollregion vor (Abb.21). Pomerantz und Hassell (1984) haben gezeigt, daß das SV40-T-Antigen diese Polyoma-Sequenzen erkennt und daran bindet.

Das Pentamer kommt an drei Bindungsstellen (A, B und C, nach Cowie and Kamen, 1984) mit unterschiedlicher Affinität für das Polyoma-T-Antigen, sowie auch im ORI-Bereich vor. Bei den Bindungsstellen A und C, wo die Affinität für das Polyoma-T-Antigen höher ist, gibt es drei bis vier Kopien von GAGGC mit 5 oder 6 Basenpaaren dazwischen, während die

Bindungsstelle B nur zwei Pentamere mit einem 5bp Spacer enthält. Die Spacer Sequenz ist überall verschieden, auch zu der Bindungsstelle I des SV40.

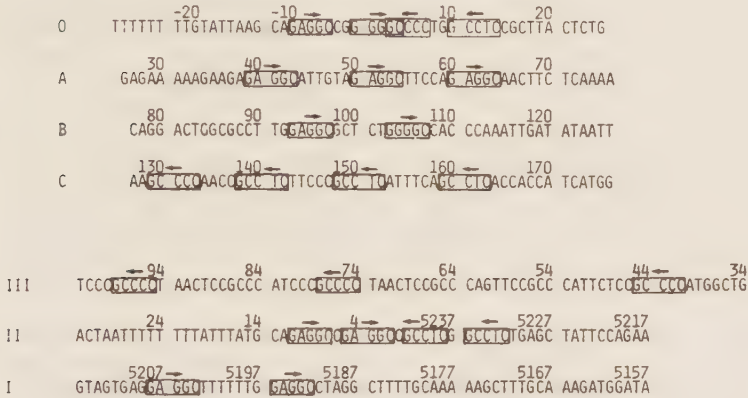


Abb.21 Nukleotid-Sequenz von Polyoma- und SV40-Kontrollregionen

Die Sequenz von Polyoma und SV40 ist entsprechend der Aufteilung der Bindungsstellen dargestellt: für SV40 I, II und III und für Polyoma A, B, C und ORI-Bereich. Consensus-Pentanukleotide -G(A/G)GGC- sind eingerahmt.

Es war für diese Arbeit nun wichtig zu untersuchen, wie das SV40-T-Antigen diese Bindungsstellen mit den verschiedenen Spacern erkennt und daran bindet. Dazu wurden vier Polyoma-enthaltende Plasmide, die Deletionen im Kontrollbereich besitzen, zur Hilfe genommen (Abb.22).

Die Plasmide wurden mit Restriktionsenzymen so gespalten, daß man möglichst die verschiedenen Bindungsstellen auf unterschiedlichen Fragmente erhielt (Abb.23). Die DNA-Fragmente wurden radioaktiv markiert und auf Bindung mit

T-Antigen aus COS1-Zellen mit einem Immunpräzipitationstest untersucht. Parallel dazu wurde die Bindung des T-Antigens an SV40 DNA (pSVwt mit HindIII und pONwt mit EcoRI/Sall) verglichen. Die DNA Bande, die spezifisch mit T-Antigen immunpräzipitiert wurde, wurde aus dem Gel geschnitten und die Aktivität gemessen; sie wurde in Prozent bezogen auf die Aktivität von pSVwt angegeben. Dabei wurde die unterschiedliche Markierung der DNAs durch das Verhältnis der Aktivität des gebundenen Fragments mit derjenigen des gleichen Fragments im Marker berücksichtigt; d.h. 100% Aktivität wurde festgesetzt als Quotient aus cpm von gebundenem HindIII-C-Fragment von pSVwt zu cpm vom gleichen Fragment der Marker DNA.

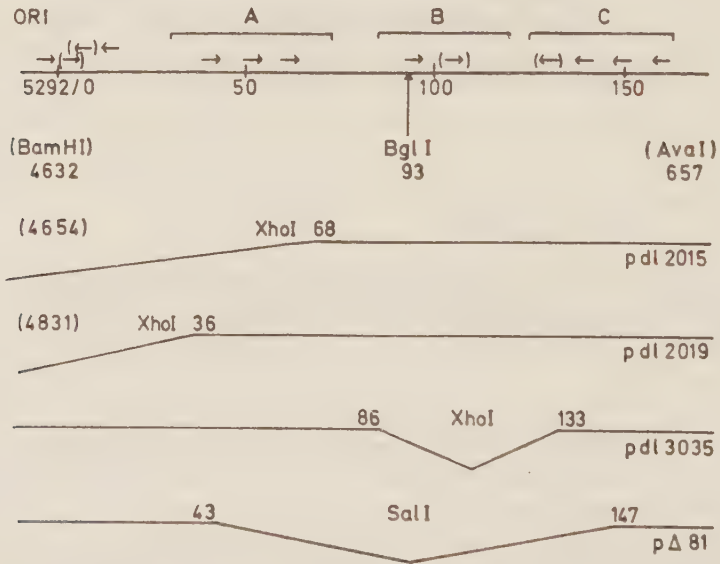


Abb.22 Schematische Darstellung der Polyoma-Plasmide

Die Polyoma-Plasmide enthalten Deletionen im Kontrollbereich des Polyomavirus; das Pentanukleotid G(A/G)GGC wird durch einen Pfeil gekennzeichnet (Pfeile in Klammern entsprechen GGGGC-Sequenzen).

Die Polyoma-DNA in pdl2015 trägt eine Deletion von Nukleotid 4654 bis 68 und einen dreifachen XhoI-Linker an der Deletionsstelle. pdl2015 wurde mit XhoI und AvaI verdaut, so daß der XhoI-Linker gespalten wird. Das 589bp AvaI/XhoI-Fragment enthielt die Bindungsstellen B und C. Es wurde von T-Antigen spezifisch gebunden, aber verglichen zu pSVwt und pONwt DNA war die Affinität viel geringer.

In pdl2019 wurden die Nukleotide zwischen 4831 und 36 deletiert, an der Deletionsstelle wurde ein XhoI-Linker eingebaut. pdl2019 wurde mit BamHI und BglI bzw. mit BamHI, BglI und AvaI verdaut: BglI spaltet direkt an Bindungsstelle B; es entsteht ein 256bp BamHI/BglI Fragment mit Bindungsstelle A und bei der dreifachen Verdauung ein BglI/AvaI Fragment von 564bp mit Bindungsstelle C. Die Bindung an das kleine Fragment war sehr gering, in einigen Versuchen kaum erkennbar. Dagegen hatte T-Antigen an das BglI/AvaI Fragment mit ca. 8% der Affinität zu pSVwt gebunden.

In der Deletionsmutante pdl3035 wurden, auch ausgehend von einem XhoI-Linker, die Nukleotide zwischen 86 und 133 entfernt. pdl3035 wurde mit AvaI, XhoI und BamHI gespalten. XhoI schneidet die DNA an der Deletionsstelle. Es ergibt sich ein 726bp langes XhoI/AvaI Fragment mit Bindungsstelle A und dem ORI-Bereich bzw. ein 544bp XhoI/AvaI Fragment mit Bindungsstelle C direkt an seinem XhoI-Ende. Beide Fragmente wurden vom T-Antigen mit unterschiedlicher Affinität gebunden. Das größere Fragment, mit Bindungsstelle A und dem ORI-Bereich, wurde mit 10% der Aktivität von pSVwt gebunden, während das 544bp Fragment nur 3-4% der pSVwt Aktivität aufwies. Dieses XhoI/AvaI Fragment enthält die Bindungsstelle C, und man würde nun entsprechend der Bindungsaktivität für die Fragmente von pdl2015 und pdl2019 eine stärkere Bindung erwarten. Die verminderte

Bindungsaktivität könnte von der Lage der Bindungsstelle direkt am Ende des Fragments verursacht werden.

Schließlich trägt p Δ 81 eine Deletion aller Bindungsstellen (zwischen 43 bis 147), außer des ORI-Palindromes. Es wurde mit BamHI und AvaI bzw. BamHI, AvaI und SalI geschnitten. SalI schneidet an der Deletionsstelle. Mit BamHI, AvaI und SalI erhält man ein 702bp Fragment, das nur den ORI-Bereich enthält und 5% der Aktivität der pSVwt-Bindung aufweist und ein 510bp Fragment mit einem Teil der Bindungsstelle C, das schwach von dem T-Antigen gebunden wurde. Bei der Messung der Aktivität wurde hier auch die unspezifische Bindung des T-Antigens berücksichtigt. Das BamHI/AvaI Fragment, das aus der Doppelspaltung entsteht, zeigt auch ca. 4% der pSVwt Aktivität bei der Bindung.

Die Ergebnisse aus vier Experimenten sind in Abb.23B zusammengefaßt.

Abb.23 Bindung von SV40-T-Antigen an Polyoma Sequenzen

A : Immunpräzipitiertes T-Antigen wurde, wie beschrieben, auf Bindung an folgende Restriktionsfragmente von pSVwt, pONwt und den Polyoma-Plasmiden getestet:

pSVwt:HindIII

pONwt:EcoRI/SalI

pdl2015:XhoI/AvaI

pdl2019:BamHI/BglII/AvaI

pdl3035:BamHI/XhoI/AvaI

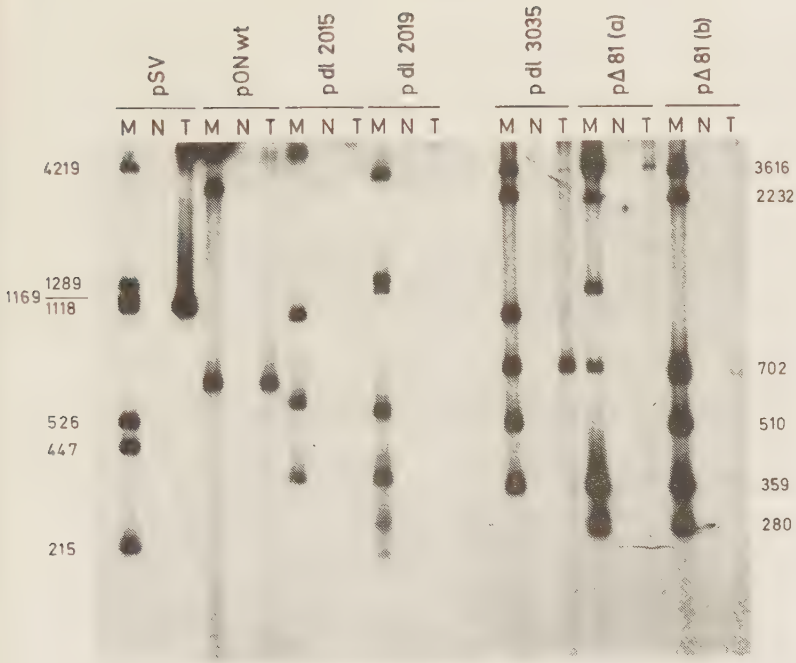
p Δ 81(a):BamHI/AvaI

p Δ 81(b):BamHI/SalI/AvaI

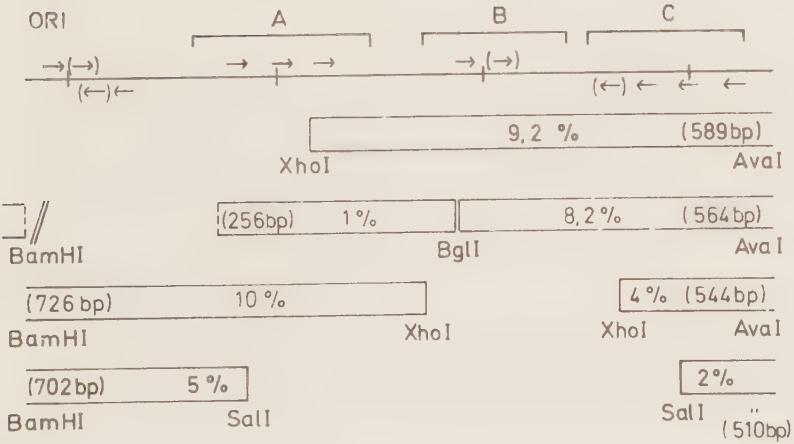
M:12.5 ng der eingesetzten DNA; N:Kontrolle mit Maus-IgG

B : Die DNA Banden wurden ausgeschnitten und die Radioaktivität in Szintillationsflüssigkeit gemessen. Die Bindungsaktivität für die einzelnen Fragmente wird in Prozente angegeben, wobei als 100% die Aktivität für pSVwt-HindIII-C-Fragment angenommen wird. (Die Ergebnisse stammen aus vier Experimenten). -s.Seite 69

A.



B.



Vergleicht man in Abb.23 die Affinität des T-Antigens für die verschiedenen Polyoma-Bindungsstellen mit der für die Bindungsstelle I des SV40 (in pONwt), dann stellt sich heraus, daß das T-Antigen an Bindungsstelle I stets mit höherer Affinität bindet.

Die Polyoma-Sequenzen stellen alle für das T-Antigen schwächere Bindungsstellen als die SV40-Sequenzen dar. Die Affinität steigt wenn mehrere dieser Bindungsstellen vorhanden sind.

BINDUNG DES SV40-T-ANTIGENS AN BK- JC- UND LPV DNA

Drei weitere Viren der Papova-Gruppe - BK, JC und LPV - besitzen Sequenzhomologien in ihrer Kontrollregion mit SV40 (Seif et al., 1979; Frisque, 1983; Pawlita et al., 1985). Sie erhalten alle das Pentanukleotid 5'-GAGGC-3', das mehrmals in dieser Region vorkommt.

Es stellte sich daher die Frage, wie das SV40-T-Antigen an diese Sequenzen bindet, die sich, wie Abb.24 zeigt, in der Bindungsstelle I in der Spacer Sequenz alle unterscheiden.

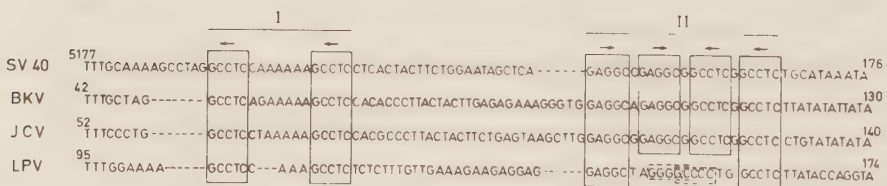


Abb.24 Sequenz in der Kontrollregion von SV40, BK, JC und LPV

Die Consensus Nukleotide sind eingerahmt.

Die Bindungsstelle II ist in der Anordnung für alle ähnlich; einzelne Basenaustausche sind außerhalb der Erkennungspentamere, und wie frühere Untersuchungen zeigten (Shortle and Nathans, 1979), beeinflussen sie die Bindung wahrscheinlich nicht.

Die DNAs dieser Viren, so wie die des SV40 wurden auf die Bindung mit SV40 T-Antigen aus COS1-Zellen durch einen modifizierten McKay-Bindungstest untersucht.

Alle DNAs wurden mit HindIII und LPV zusätzlich noch mit BamHI gespalten und anschließend am 5'-Ende mit Kinase radioaktiv markiert.

Das 587bp Fragment von BKV DNA (Abb.25A) enthielt alle möglichen Bindungsstellen für T-Antigen und wurde auch vom Protein spezifisch gebunden. Dagegen sind in dem 198bp Fragment von JC DNA nur der Bindungsstelle I ähnliche Sequenzen enthalten. Dieses Fragment wurde ebenfalls mit dem T-Antigen immunpräzipitiert; die Affinität des Proteins war jedoch geringer, verglichen mit der Bindung an BKV und SV40-DNA-Fragmente. Schließlich enthielt das 980bp Fragment von LPV DNA ähnliche Sequenzen wie beide SV40-Bindungsstellen I und II und zeigte eine spezifische Bindung an T-Antigen, die aber schwächer war als die der restlichen drei DNAs. Abb.25C zeigt nochmal die Bindung von T-Antigen an das BamHI/HindIII Fragment von LPV mit allen Bindungsstellen (b), sowie an das 377bp ApaI/BamHI Fragment (a), das nur die Bindungsstelle I enthält.

Um die Bindung an die anderen viralen DNAs mit der an SV40-DNA besser zu vergleichen, wurden jeweils die radioaktiv markierten DNAs in gleicher Menge mit pSVwt-DNA im Bindungstest eingesetzt (Abb.25B).

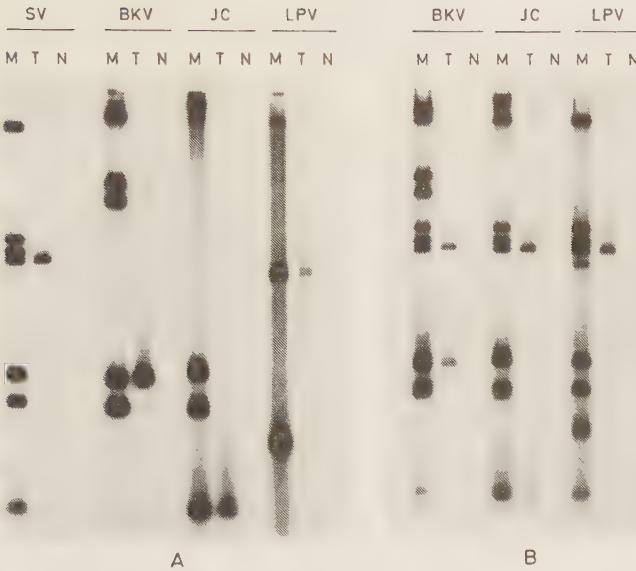
BKV-DNA kompetiert effektiv mit pSVwt um das T-Antigen; die gebundene DNA war bei beiden Plasmiden geringer als im Einzeltest. Dagegen wurde die Bindung an das 198bp-Fragment von JC in Gegenwart von SV40-DNA erheblich abgeschwächt,

während schließlich die Bindung des LPV-Fragments unter den Wettbewerbsbedingungen am geringsten war.

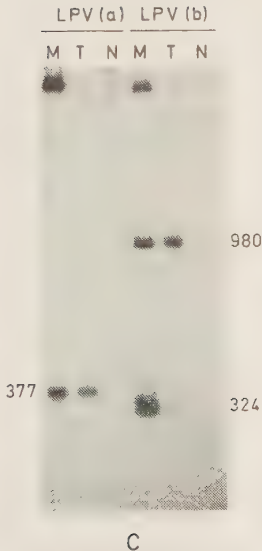
Für BKV-Sequenzen zeigte SV40-T-Antigen ähnliche Affinität wie für die eigenen viralen Sequenzen. Die Bindungsstelle I, wie Abb. 24 zeigt, unterscheidet sich geringfügig von der entsprechenden Bindungsstelle von SV40; der Austausch eines T mit C und eines G mit T scheint die Bindungsaffinität nicht zu beeinflussen.

Dies gilt nicht für den Austausch von G mit A in der Bindungsstelle von JC, da hierbei die Affinität für die JC-Sequenzen geringer ist als die für das pSVwt-HindIII-C-Fragment. Es läßt sich also feststellen, daß spezifische Nukleotidaustausche in direktem Zusammenhang mit der Bindungsaffinität stehen.

Weiterhin scheint die Deletion von drei Thymidin-Resten im Spacer, wie es bei LPV vorliegt, die Bindung zu beeinflussen. Die Verminderung der Affinität ist jedoch nicht vergleichbar mit der für pONdlSPA DNA, obwohl beide DNAs für die Bindungsstelle I identische Sequenzen besitzen. Der zusätzliche Bindungstest an der Apal/BamHI/HindIII gespaltene LPV-DNA (Abb. 25C) erbrachte den Beweis dafür, daß das nur Bindungsstelle I enthaltende Fragment doch vom T-Antigen spezifisch gebunden wurde.



**Abb.25 Bindung des
SV40-T-Antigens an BK,
JC und LPV DNA**



*Immunpräzipitiertes
COS1-T-Antigen wurde auf
Bindung an
A: 0.25 µg von
5'-endmarkierten
HindIII-Fragmenten (bei LPV
zusätzlich BamHI) von SV40,
BK, JC und LPV rekombinanter
DNA oder
B: 0.25 µg einer Mischung der
SV40-Fragmenten mit je BK, JC
und LPV DNA-Fragmente
untersucht.
C: 0.25 µg von
5'-endmarkierten
HindIII/BamHI/ApaI (a) oder
HindIII/BamHI (b) Fragmenten
von LPV rekombinanter DNA
T: Immunpräzipitation mit Pab
108, N: Immunpräzipitation mit
Maus-IgG, M: 12.5 ng der
eingesetzten DNA.
Der Test wurde wie in Abb.4
beschrieben durchgeführt.*

CHARAKTERISIERUNG DER BINDUNG VON OLIGOMEREN FORMEN VON T-ANTIGEN AN VIRALE DNA

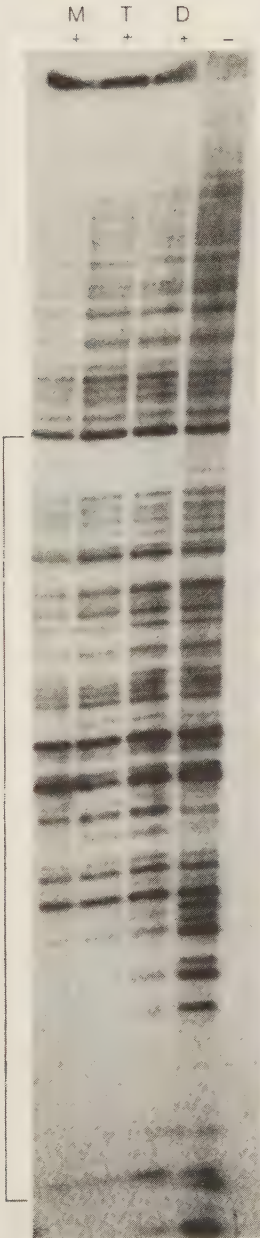
Das T-Antigen von SV40 kommt in unterschiedlich aggregierten Formen vor. Weiterhin ist bekannt, daß die virale Replikation und die Transkription durch die Bindung des Proteins an der DNA reguliert werden. Da es von Interesse ist, ob die verschiedenen Formen auch für unterschiedliche Funktionen verantwortlich sind, stellt sich die Frage, welche dieser oligomeren Formen an die DNA binden und wie sie mit den entsprechenden Sequenzen interagieren.

BINDUNGSAKTIVITÄT DER OLIGOMEREN T-ANTIGEN FORMEN

Die Subklassen des T-Antigens können durch eine Dichte-Gradienten-Zentrifugation getrennt werden. Man erhält drei Formen von T-Antigen, die bei 5S, 7S und 14S sedimentieren. Diese Fraktionen wurden von Fanning et al. (1982), sowie S. Thompson (1984) und R. Runzler (Manuskript in Vorbereitung, 1986) auf Bindung an die DNA untersucht. Sie konnten zeigen, daß die spezifische Aktivität der schneller sedimentierenden Form -des Monomers- am höchsten ist. Die 14S-Form -das Tetramer- konnte, obwohl es die in der Zelle am häufigsten vorkommende Form war, die geringste Menge an DNA binden.

Es stellte sich die Frage, ob die verschiedenen Subklassen des T-Antigens sich bei der Bindung an die DNA unterschiedlich anordnen.

Aus diesem Grunde wurden die Subklassen in ihrem Bindungsverhalten durch einen Footprint-Test untersucht. Das HindIII/KpnI-Fragment von pSVwt wurde am 5'-Ende radioaktiv markiert und mit T-Antigen Subklassen aus lytisch infizierten TC7 Zellen in einer Footprint-Analyse getestet.



**Abb.26 Footprint Analyse
der Bindung oligomerer
Formen von T-Antigen an
viraler DNA**

Das 5'-endmarkierte
HindIII/KpnI Fragment von pSV
wurde ohne (-) oder mit (+)
T-Antigen aus der 5S- (M), 7S-
(D) und 14S- (T) Fraktion
eines zentrifugierten
Dichtegradienten von lytisch
infizierten TC7-Zellen
inkubiert und weiterbehandelt
wie bei Abb.10 beschrieben.
Die Klammer deutet auf den
Bereich der Bindungsstellen
(I, II).

Abb.26 zeigt, daß alle drei Subklassen die gleichen Regionen auf der DNA vor DNAase-Aktivität geschützt haben. Der Schutz an der Bindungsstelle I ist besser als an der Bindungsstelle II, was auch bei den nachfolgenden Untersuchungen mit Extrakten aus transformierten Zellen gezeigt wurde.

Durch Untersuchungen mit den synthetischen DNA-Sequenzen der Bindungsstelle I, sowie durch weitere Experimente von Tegtmeyer et al. (1983) wurde angenommen, daß stöchiometrisch pro Erkennungssequenz ein T-Antigen Molekül gebunden wird. Mastrangelo et al. (1985) haben dies bestätigt; sie zeigten, daß an der Bindungsstelle I die Masse eines Di- bzw. Trimers bindet, während an der Bindungsstelle II vier Moleküle binden. Ob die Oligomere als solche binden oder sich erst nach der Bindung formen, konnte nicht beantwortet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Verhältnisse von Oligomeren an den Bindungsstellen unternommen.

Dazu wurde der schon beschriebene Gel-Retention Assay zu Hilfe genommen. Das NaeI/TaqI Fragment von pONwt, das die Bindungsstelle I enthält, wurde radioaktiv markiert und mit jeweils 10µl aus Fraktionen von T-Antigen Subklassen aus lytisch infizierten TC7 Zellen unter den schon beschriebenen Bedingungen inkubiert und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Um spezifisch gebundene DNA Banden zu erkennen, wurde in parallelen Ansätzen die Bindung mit spezifischer unmarkierter (pONwt) oder unspezifischer (pAT153) Plasmid DNA in 30fachen Überschuß kompetiert.

Abb.27 zeigt, daß bei der 5S T-Antigen Fraktion, der Monomer-Fraktion, zwei spezifische Banden erscheinen; für die schneller laufende Bande (c) wird angenommen, daß sie einem Komplex von Monomer-T-Antigen Formen mit der DNA entspricht, während für die höher laufende Bande ein Komplex

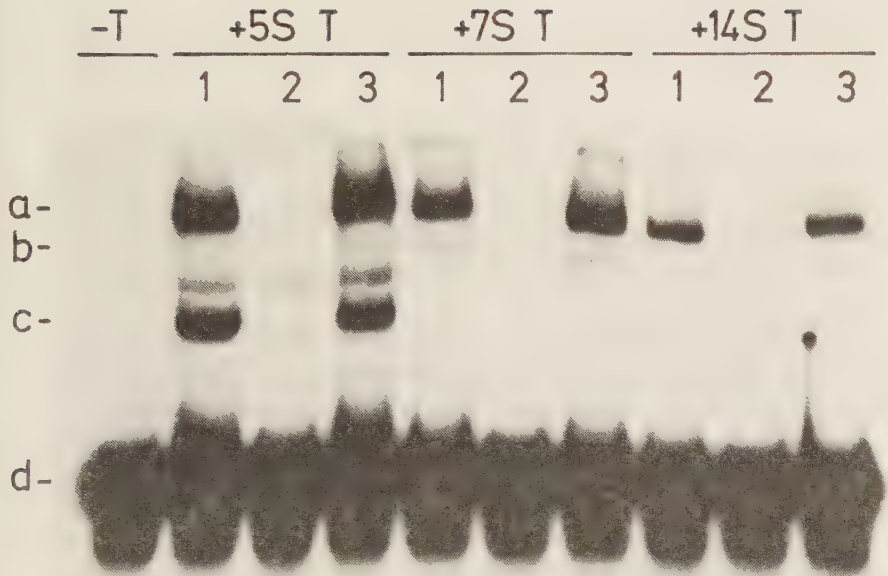


Abb.27 Gel Retention Assay des Komplexes von Bindungsstelle I mit den oligomeren Formen des T-Antigens

Das 5'-endmarkierte NaeI/TaqI Fragment von pONwt (d) wurde ohne (-) oder mit (+) je 10 μ l der 5S-, 7S und 14S-Fraktion eines zentrifugierten Dichtegradienten von lytisch infizierten TC7 Zellen inkubiert. Ansatz 1 enthält 0.75 μ g beschallte E.coli DNA, Ansatz 2 0.75 μ g pONwt-DNA und Ansatz 3 0.75 μ g pAT-DNA. Die Plasmid-DNAs wurden ebenfalls mit NaeI/TaqI gespalten.

Die Ansätze wurden auf ein 6%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie charakterisiert.

einer oligomeren Form des T-Antigens mit der Bindungsstelle I vermutet wird; - die über (c) laufende Bande ist unspezifisch und Bande (d) entspricht der freien ungebundenen DNA. In der 7S Fraktion, der "Dimer"-Fraktion, wird die DNA von der gleichen oligomeren Form (a) gebunden; eine darunter laufende schwache Bande (b) läßt sich von spezifischer DNA kompetieren, aber es ist nicht klar, welchem Komplex sie entspricht.

Schließlich bildet sich mit dem T-Antigen aus der 14S-Fraktion, der Tetramer-Fraktion, der gleiche Komplex einer oligomeren Form mit der DNA wie in den anderen zwei Fraktionen.

Der DNA-Protein-Komplex (c) in der 5S-Fraktion kommt nur in dieser Fraktion vor und entspricht wahrscheinlich den an Bindungsstelle I-gebundenen T-Antigen Monomeren. Dagegen kann man die oligomere Form, die den Komplex (a) mit der DNA bildet, nicht eindeutig einem Di- oder Tetramer zuordnen. Man würde allerdings laut Ryder et al. (1985) erwarten, daß es sich dabei um einen Dimer-DNA Komplex handelt.

In der Sequenz von Bindungsstelle I, die in pONwt einkloniert ist, kommen nur zwei Pentanukleotide vor, und da durch frühere Untersuchungen angenommen wird, daß pro Pentamer ein T-Antigen Monomer bindet, liegt es nahe anzunehmen, daß hier ein Dimer-DNA-Komplex vorliegt. Dieser Komplex würde sich in der 5S-Fraktion aus zwei gebundenen Monomeren bilden, in der 7S-Fraktion aus den vorhandenen Dimeren, während in der 14S-Fraktion Dimer-Verunreinigungen und/oder dissoziierte Tetramere beteiligt wären.

Um die Frage zu beantworten, ob es sich bei diesen DNA-Protein-Komplexen um Di- oder Tetramer-Formen handelt, wurde die Bindung auf ein die Bindungsstelle II enthaltendes Fragment unter den gleichen Bedingungen untersucht. Man würde erwarten, daß sich auf Bindungsstelle II, wo vier Erkennungssequenzen vorkommen, ein Tetramer-DNA Komplex

bildet.

Für diese Untersuchungen wurde das *NcoI/HindIII* Fragment von p1097 verwendet. In p1097 enthält die SV40 DNA eine Deletion von 31bp der Bindungsstelle I zwischen den Nukleotiden 5178 und 5208.

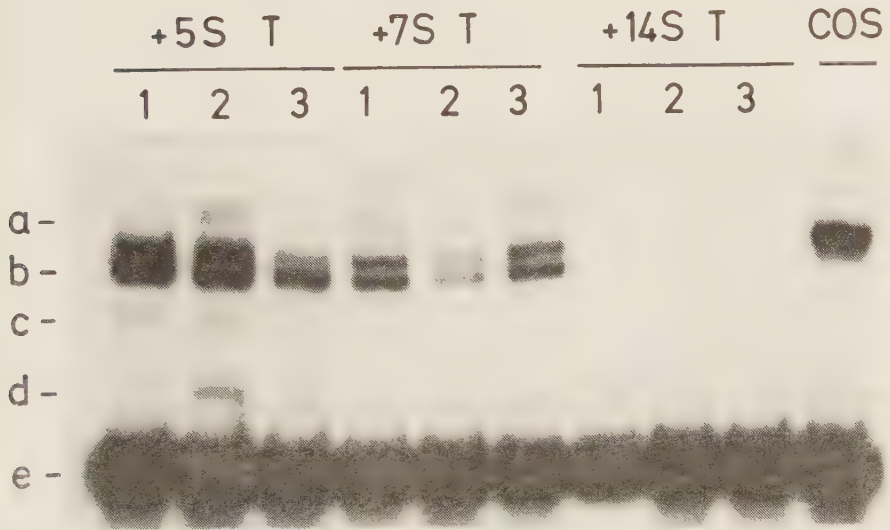


Abb.28 Gel Retention Assay des Komplexes von Bindungsstelle II mit den oligomeren Formen des T-Antigens

Das 5'-endmarkierte *HindIII/NcoI* Fragment von p1097 wurde, wie in Abb.27 beschrieben, behandelt. Zusätzlich wurde auch ein Ansatz mit 10 μ l COS1-Extrakt aufgetragen.

Das endmarkierte 78bp lange Fragment von p1097 wurde mit je 10 μ l der 5S-, 7S- und 14S-Fractionen und mit COS1 Extrakt inkubiert und, wie schon beschrieben, mit den entsprechenden spezifischen oder unspezifischen DNAs kompetiert.

Abb.28 zeigt, daß in der 5S-Fraktion ohne kompetierende DNA eine schwache Bande (a), eine Doppelbande (b) und eine weitere schwache Bande (c) vorkommen. Bande (e) entspricht dem freien DNA-Fragment.

Im Unterschied zu pONwt werden die Banden (a) und (c) durch Zugabe von spezifischer unmarkierter p1097 DNA verstärkt. Die Doppelbande (b) scheint sich dabei nicht zu verändern. Der Ansatz mit unspezifischer DNA ähnelt dem ohne kompetierende DNA, mit dem Unterschied, daß alle Banden schwächer erscheinen. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich darin, daß eine geringere Menge an T-Antigen zugegeben wurde. Die Bande (d) ist unspezifisch für T-Antigen, dafür spricht die Größe des Komplexes.

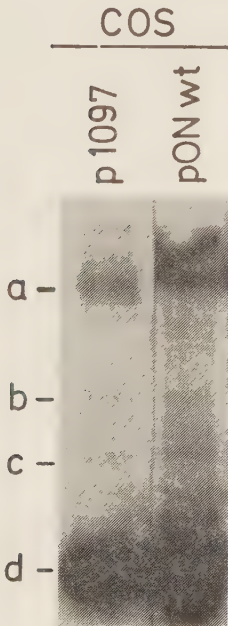
Als spezifische Banden in diesen Ansätzen, d.h. solche, die Komplexen aus spezifisch gebundenem T-Antigen und DNA entsprechen, können nur die Banden (a) und (c) erkannt werden. Daß sie sich in umgekehrter Weise als bei der Bindung der 5S-Fraktion an pONwt von spezifischer DNA nicht kompetieren lassen, sondern verstärkt vorkommen, kann so erklärt werden: T-Antigen hat eine geringe Affinität für die Bindungsstelle II und unter den vorhandenen Bedingungen bei dem Gel Retention Assay könnte das Gleichgewicht durch Zugabe von mehr Substrat (unmarkierte spezifische DNA) zur gebundenen Form verschoben werden.

In der 7S-Fraktion kommen die Bande (a) und die Doppelbande (b) vor. Der Komplex (a) aus oligomeren T-Antigen und markierter DNA wird durch Zugabe spezifischer DNA kompetiert. Dies gilt auch für die Doppelbande (b); ob sie spezifischen T-Antigen-Komplexen mit DNA entspricht, ist fraglich, da sie sonst bei ähnlichen Experimenten nicht vorhanden war und da sich in der 5S-Fraktion ihre Intensität

bei Zugabe spezifischer oder unspezifischer DNA nicht änderte.

In der 14S-Fraktion wurde in keinem der durchgeführten Experimente eine Bindung des Proteins an die DNA beobachtet. Dies korreliert mit Ergebnissen mit dem modifizierten McKay-Assay, wo die 14S-Fraktion das HindIII-C Fragment von p1097 nicht binden konnte (pers. Mitteilung: R.Runzler).

Es bleibt also immer noch die Frage, welche oligomeren Formen mit dem pONwt Fragment (Bindungsstelle I) und dem p1097 Fragment (Bindungsstelle II) einen Komplex bilden. Der Vergleich der vorkommenden Komplexe von Proteinen aus dem COS1 Extrakt mit der Bindungsstelle I und der Bindungsstelle II in Abb.29 zeigte, daß es sich dabei um die gleichen Banden handelte.



**Abb.29 Gel Retention Assay
von Komplexen der
Bindungsstellen I und
II mit COS1-Extrakt**

Die markierten Fragmente von pONwt und p1097 (vergl. Abb.27 und 28) wurden mit COS1-Extrakt inkubiert und die Ansätze wurden, wie schon beschrieben, charakterisiert.

Der Unterschied von 11bp zwischen NaeI/TaqI Fragment von pONwt (89bp) und NcoI/HindIII Fragment von pl097 (78bp) sollte nicht zu gravierenden Unterschieden führen. Vergleicht man schließlich in Abb.28 das Laufverhalten der Komplexe von COSI Extrakt-Proteinen Bindungsstelle II mit den Komplexen des T-Antigens aus den Fraktionen, dann stellt sich heraus, daß die Hauptbande mit COSI-Extrakt schneller als die Bande (a) läuft.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die vorhandenen T-Antigen-Monomere in der 5S-Fraktion einen Komplex mit Bindungsstelle I und mit Bindungsstelle II bilden - Bande (c) in Abb.27 und 28. Dieser Komplex wird auch aus Monomer T-Antigen vom COSI-Extrakt mit den DNAs beider Bindungsstellen geformt. Diese Monomer-Form in dem Extrakt transformierter Zellen (COSI) entsteht wahrscheinlich durch die Dissoziation vorhandener Tetramere. Weiterhin bilden Dimere aus der 7S Fraktion, sowie solche aus dissoziierten Tetrameren der 14S Fraktion einen Komplex mit Bindungsstelle I. Dieser ist auch der vorwiegend vorkommende Komplex bei der Verwendung von COSI-Extrakten für die Bindung an diese Bindungsstelle und auch für die Bindung an Bindungsstelle II -vergleiche Bande (a) in Abb.29 und 28. Schließlich zeigen Tetramere keine Bindungsaktivität für beide Bindungsstellen; bei Bindungsstelle II kommt überhaupt kein Komplex vor, während die Bindungsstelle I von den schon erwähnten dissoziierten T-Antigen Oligomeren gebunden wird.

Der einzige Fall, wo man Protein-DNA Komplexe sieht, die der Größe eines Tetramers auf dem DNA-Fragment entsprechen konnten, ist bei der Bindung der 7S Fraktionen mit Bindungsstelle II (Abb. 28). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um zwei (angereicherte) Dimere, die an den vier Erkennungssignalen dieser Sequenz binden können. Ob eine der Banden aus der Doppelbande (b) nicht unspezifisch ist und doch einen Dimer-DNA Komplex entspricht, konnte nicht bestätigt werden.

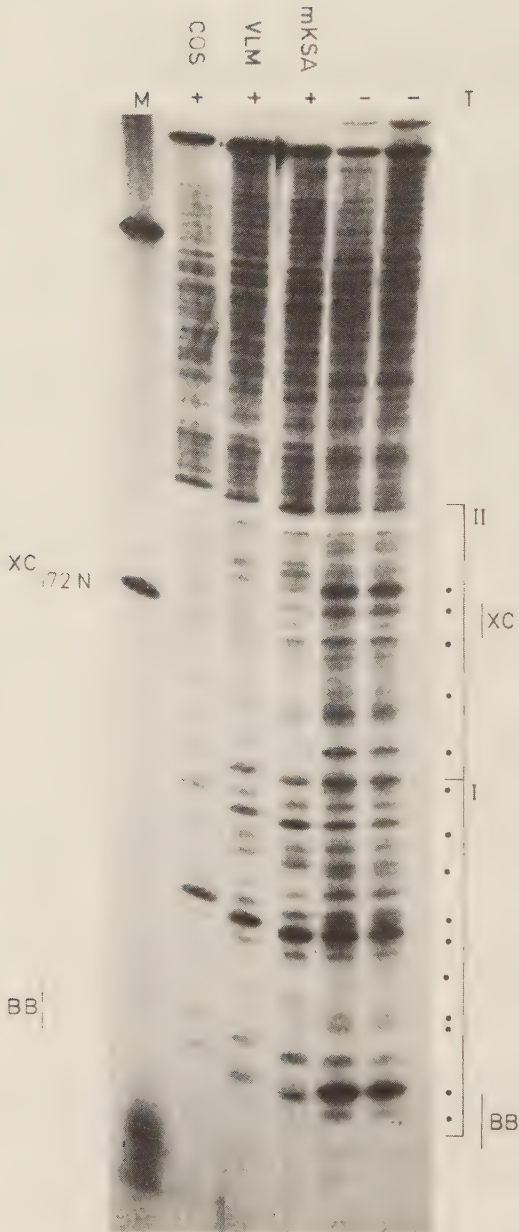
DNA-BINDUNG MIT MUTIERTEN T-ANTIGENEN AUS TRANSFORMIERTEN ZELLINIEN

In einer Reihe von Zelllinien, die durch SV40 transformiert wurden, kann das exprimierte T-Antigen die virale DNA Replikation nicht initiieren. Diese Zellen bieten sich daher als geeignete Untersuchungsobjekte an, um die Korrelation der biochemischen Aktivitäten mit den unterschiedlichen biologischen Aktivitäten dieses Proteins (die Replikation und die Transformation) zu studieren. Da bekannt ist, daß die Bindung des T-Antigens an die virale DNA (Shortle et al, 1979; Margolskee and Nathans, 1984) - und speziell an Bindungsstelle II - eine Rolle bei der Replikation spielt, stellte sich die Frage, wie die mutierten T-Antigene mit den bekannten Bindungsstellen der Kontrollregion von SV40 interagieren würden.

Die Zelllinien, die für diese Untersuchungen gebraucht wurden, stammen aus drei verschiedenen Spezies und können Tumore in Tieren verursachen. Das T-Antigen aus COS1 Zellen (mit ORI-defektem-SV40 transformierte Affenzellen - CV1) entspricht dem Wildtyp-T-Antigen. VLM und KSA sind Maus-Zelllinien und H65/90B und THK-1t stammen von Hamstern. In VLM Zellen wird außer dem 90kd T-Antigen (von Wildtyp-Größe) ein Super T-Antigen von 140kd und ein 100kd T-Antigen exprimiert. In KSA Zellen kommt zusätzlich ein 84kd T-Antigen vor.

Burger und Fanning (1983) haben gezeigt, daß T-Antigen aus diesen transformierten Zelllinien an SV40-DNA mit unterschiedlicher Aktivität binden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde ferner untersucht, welche Sequenzbereiche bei der Bindung dieser T-Antigene betroffen sind und mit welcher Aktivität die mutierten Proteine an den einzelnen Bindungsstellen binden.



**Abb.30 Footprint Analyse mit
Extrakten von COS1, VLM
und mKSA Zellen**

Das 3'-endmarkierte
HindIII/KpnI Fragment von
pSVwt wurde ohne (-) oder mit
(+) immunpräzipitiertem
T-Antigen aus COS1, VLM und
mKSA Zellen in 100 mM NaCl-PNE
inkubiert. Die DNA wurde mit
0.05 u DNAase abgebaut, auf
Sequenzgelen aufgetrennt und
durch Autoradiographie
charakterisiert.

M: BglI/HindIII gespaltene
pSVwt-DNA

XC: Höhe der Xylencyanol-Bande

BPB: Höhe der

Bromphenolblau-Bande

Die Klammern bezeichnen die
Bindungsstellen I und II, und
die Punkte weisen auf
geschützte Banden hin.

Um zu testen, wie sich bei der Bindung die mutierten T-Antigene aus Maus-Zelllinien im Vergleich zu Wildtyp-T-Antigen (aus COS1 Zellen) auf der DNA anordnen, wurde eine Footprint-Analyse mit Extrakten aus diesen Zellen durchgeführt.

Der Test wurde, wie bereits im ersten Abschnitt (Seite 33) dargestellt, angesetzt. Für den Footprint wurde das HindIII/KpnI-Fragment von pSVwt verwendet, das 366bp lang ist und die gesamte Kontrollregion von SV40 enthält. Es wurde am HindIII-Ende mit Klenow-Polymerase radioaktiv markiert.

Abb.30 zeigt den geschützten DNA-Bereich von COS1, VLM und KSA T-Antigen. Man kann feststellen, daß das Schutzmuster der DNA für alle drei Proteine vergleichbar ist. Dies bedeutet, daß trotz des Vorhandenseins verschiedener T-Antigene in den Mauszelllinien, die Sequenzen, an denen T-Antigen bindet und vor DNAase-abbauender Aktivität schützt, die gleichen sind. Mehrere Footprint Analysen haben das gleiche Ergebnis für diese Zelllinien gebracht; außerdem konnte man feststellen, daß unter den gegebenen Bedingungen der Schutz für die Bindungsstelle II schwächer war.

Die früheren Bindungsexperimente (von Burger und Fanning, 1983) wurden mit dem Immunpräzipitationstest und einem großen Überschuß von DNA durchgeführt und hatten hauptsächlich die Bindungsaktivität für die stärkere Bindungsstelle I gezeigt. Es ergab sich daraus, daß T-Antigen aus VLM, KSA und THK-Zellen ungefähr die gleiche spezifische Aktivität wie T-Antigen aus infizierten Zellen zeigte; H65/90B-T-Antigen dagegen konnte die DNA nur schwächer binden.

In den folgenden Untersuchungen wurde der modifizierte McKay-Test benutzt, und es wurde die Bindungsaktivität für die Bindungsstelle II (in p1097, mit deletierter Bindungsstelle I) mit der für beide Bindungsstellen (in

pSVwt) verglichen.

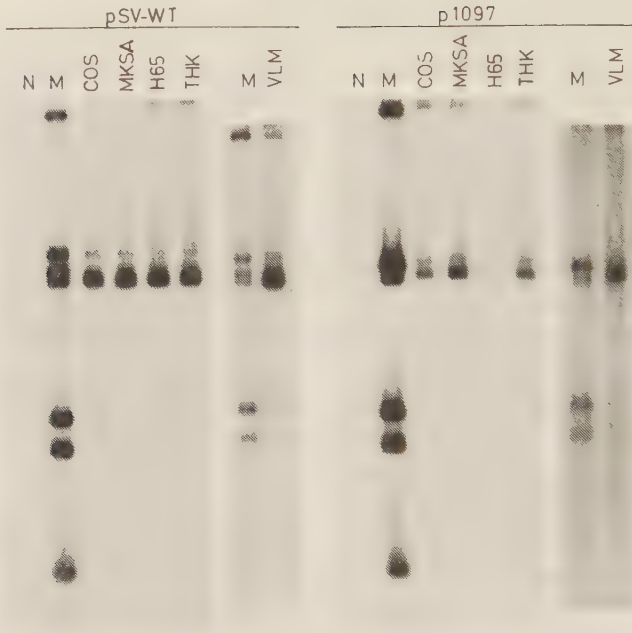


Abb.31 Bindung des T-Antigens aus SV40-transformierten Zellen an viraler DNA

Das T-Antigen wurde mit Pab 108 -oder (N) Maus-IgG- und *S.aureus* aus den Extrakten von COS1, MKSA, H65/90B, THK-1t und VLM Zellen immunpräzipitiert und auf Bindung an 5'-endmarkierten HindIII-C Fragment von pSVwt oder p1097 nach der bei Abb.4 beschriebenen Methode untersucht.
M: 12.5 ng der eingesetzten DNA

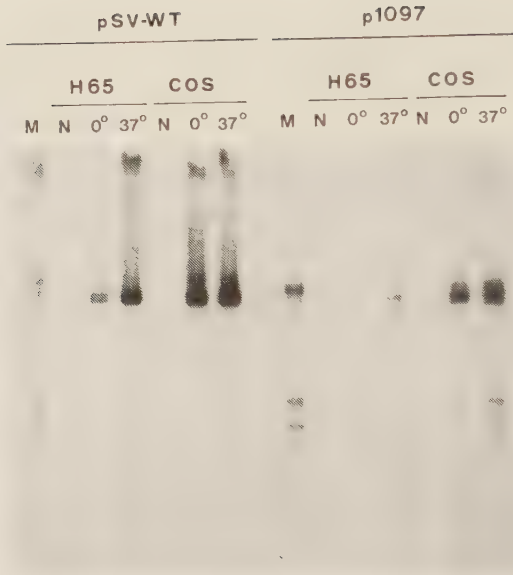
Die T-Antigen Menge von jedem Zelltyp wurde in jedem Ansatz entsprechend der Bindungsaktivität eingestellt.

Das wt-T-Antigen aus COS1-Zellen und die T-Antigene der Mutanten hatten alle das HindIII C-Fragment von pSVwt spezifisch gebunden (Abb.31). Das gleiche Fragment von p1097 wurde mit ca. 25% der Aktivität für den pSVwt-Origin von COS1, Δ KSA, THK-1t und VLM T-Antigenen gebunden. Dagegen konnte mit Zellextrakt aus H65/90B Zellen keine Bindung mit p1097 nachgewiesen werden. Dies war ein erster Hinweis, daß die fehlende Bindung von H65-T-Antigen an Bindungsstelle II mit dem Replikationsdefekt dieser Mutante zusammenhängen könnte.

Alle bisher beschriebenen DNA Bindungsuntersuchungen wurden bei 0°C durchgeführt, um das T-Antigen im Proteinextrakt möglichst stabil zu halten. Da vermutet wird, daß die effektive Bindung des T-Antigens an die Bindungsstelle II von der Temperatur abhängig ist (Dixon and Nathans, 1985), wurde der gleiche Bindungstest für COS1 und H65/90B-T-Antigen bei 0° und 37°C durchgeführt.

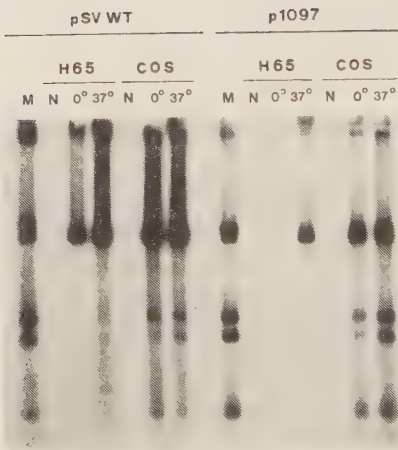
Das COS1-T-Antigen bindet bei 0°C die Kontrollregion von SV40 und mit verminderter Affinität auch die Bindungsstelle II allein (Abb.32). Dagegen kann das H65/90B-T-Antigen bei derselben Temperatur nur an den ganzen wt-ORI-Bereich binden, allerdings nur schwächer als das COS1-T-Antigen, während Bindungsstelle II unter diesen Bedingungen nicht gebunden wird.

Erhöht man die Temperatur bei der Bindung auf 37°C, so verändert sich das Bindungsverhalten des COS1-T-Antigens nur gering für die Kontrollregion bzw. für die Bindungsstelle II allein. Im Gegensatz dazu wird bei dieser Temperatur die Bindung von H65/90B-T-Antigen an die wt-Kontrollregion erhöht und man erhält sogar eine schwache Bindung an Bindungsstelle II.



b

**Abb.32 Bindung des
T-Antigens aus COS1 und
H65/90B Zellen an
viraler DNA bei
0°C und
37°C**



a

Wie Abb.31, aber zusätzlich
Bindung bei 37°C für 1h.

a: 24h Exposition des Gels

b: 8h Exposition des Gels

Diese Untersuchungen zeigten, daß das H65/90B T-Antigen an Bindungsstelle II nur schwach bindet, und daß dies eine Rolle bei der fehlenden Funktion in der Replikation dieses Proteins spielen könnte. Weitere Untersuchungen (Huber et al., 1985) haben gezeigt, daß dies aber nicht die einzige biochemische Aktivität dieses T-Antigens sein könnte, die für seine defekte biologische Funktion verantwortlich ist.

Um zu testen ob dieser Unterschied der Bindungsaktivität von H65/90B-T-Antigen verglichen mit Wildtyp T-Antigen auch bei der Anordnung der T-Antigene auf der DNA zu erkennen ist, wurde eine Footprint-Analyse durchgeführt. Das HindIII/NcoI Fragment des pEP-Plasmids, das die SV40-Kontrollregion enthält, wurde mit Polynukleotid-Kinase am HindIII-Ende radioaktiv markiert und mit COSI bzw. H65/90B Proteinextrakten in 100mM Salz und bei 0°C einem DNAase-Footprinting - wie schon beschrieben - unterworfen. Man erkennt in Abb.33, daß von den Proteinen beide Regionen geschützt werden. Der Schutz der Bindungsstelle II ist bei beiden Proteinen nicht so effektiv wie der für die Bindungsstelle I, er ist jedoch stärker im Fall von COSI-T-Antigen.

Damit ergab sich ein weiterer Nachweis über das unterschiedliche Verhalten von H65/90B-T-Antigen bei der Bindung an der Bindungsstelle II, was wahrscheinlich einen Effekt bei dem fehlenden Replikationsvermögen dieser Mutante ausübt.

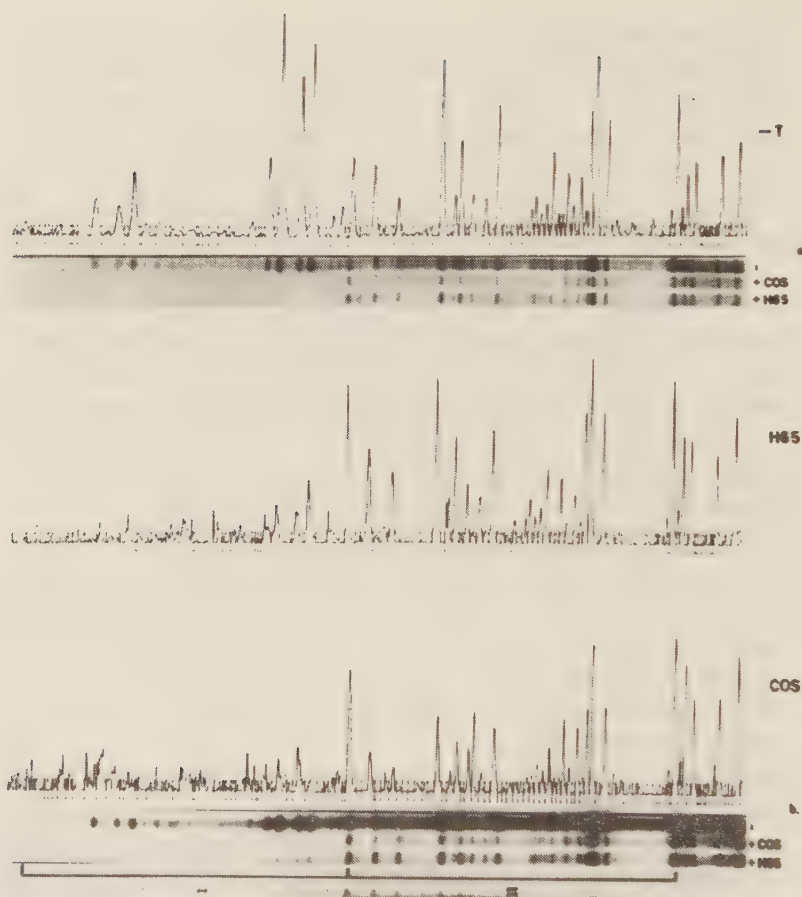


Abb.33 Footprint Analyse der SV40-Kontrollregion mit Extrakten aus COS1 und H65/90B Zellen

Das 5'-endmarkierte HindIII/NcoI Fragment von pEP wurde ohne (-) oder mit (+) Extrakt aus COS1 oder H65/90B Zellen inkubiert.

Die weitere Untersuchung wurde, wie in Abb.30 beschrieben, durchgeführt.

a und b Exposition mit und ohne Verstärkerfolie (Film: Kodak XAR 5)

Die Ansätze wurden durch densitometrische Messung ausgewertet. (Die Plotlänge entspricht der Filmlänge).

V. D I S K U S S I O N

Das Ziel dieser Arbeit war es, Fragen der Interaktionen des SV40-T-Antigens mit der DNA zu beantworten, indem einerseits die Voraussetzungen für die DNA Sequenz und andererseits die Struktur des Proteins bzw. das Verhalten von mutierten Formen des Proteins bei der Bindung untersucht werden sollten. Im Folgenden wird versucht, diese Ausgangsfrage unter Berücksichtigung der experimentellen Ergebnisse zu beantworten.

Zu Beginn möchte ich die angewendeten Methoden diskutieren. Tjian (1978) und Tegtmeyer et al. (1981) haben als erste durch Filterbindungsexperimente und Immunpräzipitationen mit Anti-Tumor-Sera die Bindungsstellen des T-Antigens auf der DNA definiert. Später wurde dafür die Footprint-Analyse verwendet, wobei entweder zu 95% gereinigtes Ad2-T-Hybrid-Protein (Tjian, 1978) oder 40% reines T-Antigen aus lytisch infizierten Zellen (Tegtmeyer et al., 1981) benutzt wurden.

In meinen Experimenten habe ich die Footprint-Analyse so modifiziert, daß ausgehend von rohen Proteinextrakten aus T-Antigen transformierten oder lytisch infizierten Zellen und mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern und Protein A von Staphylococcus aureus, die T-Antigen Bindung an DNA untersucht werden konnte. Der Vergleich dieser Footprint Experimente mit solchen mit gereinigtem Protein (von Dr. Tegtmeyer) zeigte, daß die Komponenten der Immunpräzipitation bei dem Test nicht interferieren. So konnte auch bewiesen werden, daß der monoklonale Antikörper Pab 108, der hier, sowie bei dem Bindungstest mit Immunpräzipitation benutzt wurde, die DNA Bindung nicht hindert. Außerdem bietet die modifizierte Footprint-Analyse den Vorteil, verschiedene Mutanten des T-Antigens oder oligomere Formen des Proteins bei der DNA Bindung zu

untersuchen, ohne sie vorher isolieren zu müssen.

Die grundlegende Idee, das Protein durch monoklonale Antikörper anzureichern, wurde neuerdings auch zur Reinigung des Proteins durch Immunoaffinitäts-Chromatographie verwendet (Dixon and Nathans, 1985).

Weiterhin bot sich der Gel-Retention-Assay nach Fried und Crothers (1981) als geeignetes Untersuchungssystem von Protein-DNA-Komplexen an. Durch ihn konnte gezeigt werden, welche Protein-Formen mit der DNA in Wechselwirkung stehen. Die Frage, ob die Protein-DNA-Komplexe aus den Extrakten spezifisch sind, wurde durch Kompetition mit spezifischer bzw. unspezifischer DNA und auch durch den Vergleich mit Komplexen von gereinigtem T-Antigen beantwortet.

Die Beobachtungen früherer Untersuchungen, die gezeigt haben, daß einerseits das T-Antigen bei der Bindung eine bestimmte Consensus-Sequenz erkennt und andererseits mit höchster Affinität an die Bindungsstelle I bindet, warfen hier die Frage nach den Mindest-Voraussetzungen für eine hoch affine Bindungsstelle auf.

Es wurde nun gezeigt, daß zwei Erkennungs-Pentanukleotide der Bindungsstelle I und ihre dazwischen liegende Sequenz (d.h. insgesamt 17bp) für die starke DNA Bindung des T-Antigens ausreichen. Dieser DNA-Bereich, sowie 5-7bp an jeder Seite davon, wurden vor DNAase Aktivität in einem Footprint-Test geschützt.

Die systematische Analyse mit Mutanten wies darauf hin, daß alle drei Teile dieser Sequenz, d.h. die zwei Pentamere und der 7bp-Spacer, für die hohe Bindungsaffinität des T-Antigens erforderlich sind.

Die Sequenzspezifität der Pentamere ist wichtig für die Bindung, da bei den Substitutionen wie in pONsubPEN die Bindungsaffinität stark vermindert wurde.

Die Methylierungs-Schutz-Experimente von K.Ryder (Ryder et al., 1985) mit den Mutanten haben außerdem gezeigt, daß beide

Pentanukleotide in gleichem Maße bei der Bindung beteiligt sind. Für beide Pentamere war der Methylierungs-Schutz der enthaltenen Guanine gleich groß, sowohl im Wildtyp als auch bei veränderten Spacer-Sequenzen.

Weiterhin deutete die niedrigere Bindungsaffinität des pONinvPEN Klons daraufhin, daß die Orientierung des Pentamers für die Bindung eine Rolle spielt.

Die Anordnung der Pentamere hier wies Ähnlichkeiten mit der Bindungsstelle II auf, an der jeweils zwei Pentanukleotide mit 7bp dazwischen in entgegengesetzter Orientierung angeordnet sind. Trotzdem konnte man mit dem pONinvPEN Klon im Immunpräzipitationstest fast keine Bindung feststellen, während an der Bindungsstelle II allein (in p1097, bei dem die Bindungsstelle I deletiert ist) die Bindungsaktivität auf ca. 25% der Wildtyp-Aktivität vermindert ist. Dies war ein erster Hinweis auf die unterschiedliche Anordnung des T-Antigens an den Bindungsstellen I und II.

Die Bedeutung der Spacer Sequenz bei der Bindung des T-Antigens an Bindungsstelle I haben die Experimente mit den veränderten Spacer-Mutanten (pONdlSPA, dlSPAA und subSPA) gezeigt. Es ließ sich feststellen, daß für die Bindung nicht nur die Länge, sondern auch die Sequenzspezifität eine Rolle spielen.

Eine Länge von 4bp in pONdlSPA scheint für die Bindung nicht geeignet zu sein. Dagegen zeigte die Deletion eines einzelnen A/T-Paares (pONdlSPAA) einen geringeren Effekt auf die Bindungsaktivität. Bei den Polyoma-Sequenzen, bei denen die Pentamere durch 5 oder 6 Nukleotide voneinander entfernt sind, konnte man ebenfalls Bindungsaktivität des T-Antigens feststellen, die jedoch viel geringer war als die für SV40-Bindungsstelle I. Ob hierbei die Länge der Spacer (vergleichbar mit pONdlSPAA) oder das noch zu diskutierende Vorkommen von wiederholten Bindungsstellen die Ursache für diese Bindungsaktivität ist, konnte nicht beantwortet

werden.

Aber auch gegen die Behauptung, daß ein Spacer von 4bp Länge für die Bindung nicht geeignet ist, ist einzuwenden, daß bei LPV-DNA, bei der die 14bp der Bindungsstelle I identisch mit dlSPA sind, dennoch SV40-T-Antigen-Bindung nachgewiesen werden kann. Dies spricht für eine Bedeutung der benachbarten Sequenzen, die ebenfalls berücksichtigt werden sollten.

Schließlich haben Pomerantz und Hassell (1984) über die Bindung des SV40-T-Antigens an hintereinander geschaltete XhoI-Linker berichtet, bei denen zwischen zwei GAGGC-Pentameren ein 4bp-Abstand vorlag. Jedoch konnte eine Bindung erst ab einer Mindestlänge von fünf Linkern, d.h. vier Erkennungspentanukleotiden, nachgewiesen werden. Dies läßt darauf schließen, daß hauptsächlich das wiederholte Vorkommen der Pentamere entscheidend für die Bindung ist. Die Sequenzspezifität der Spacer Region bei den SV40-T-Antigen Interaktionen an Bindungsstelle I wurde durch das Bindungsverhalten von pONsubSPA ebenfalls erkannt. Ein weiterer Hinweis dafür war die stark verminderte Bindungsaffinität des T-Antigens für eine Adenovirus-Sequenz (Ad5ElB), die zwei gleich orientierte Pentamere mit einem Spacer von 7bp enthielt (untersucht von B.Vogt). Dagegen wurden die der SV40-Bindungsstelle I ähnlichen Sequenzen von BK und JC Viren vom T-Antigen spezifisch erkannt und gebunden. Die Bindungsaktivität war vergleichbar mit der für SV40-Sequenzen, obwohl bei BK zwei Nukleotide und bei JC ein Nukleotid im Vergleich zum SV40 verschieden sind. Trotzdem bleibt bei diesen Klonen -im Gegensatz zu pONsubSPA- eine (A)₅ Sequenz erhalten, die wie unten noch erläutert wird, wichtig für die Funktion des Spacers ist.

Zu untersuchen ist nun, wie diese Spacer-Sequenz ihre Funktion bei der Bindung des T-Antigens ausübt.

Jones and Tjian (1984) haben durch

Alkylierungsinterferenz-Experimente gezeigt, daß in dieser Region das T-Antigen mit Phosphat-Resten an dem einen Strang der DNA interagiert. In der "minor groove" der DNA trat nur ein Adenin-Rest mit dem Protein in Wechselwirkung. Dieser Rest ist bei pONsubSPA erhalten, ohne daß dabei das Bindungsverhalten dieses Klon verbessert wird. Es scheint daher wahrscheinlich -auch wegen der asymmetrischen Struktur des Spacers-, daß sein Wirkungsmechanismus nicht in der direkten Interaktion des Proteins mit der DNA liegt. Die Besonderheit der Sequenz $-C(A)_6-$ spricht eher für eine Bedeutung bei der Konformation der DNA. Die ersten Hinweise dafür stammen von Untersuchungen von Arnott et al. (1983), die für poly dA-poly dT Sequenzen eine besondere heteronome DNA-Form (H-DNA) vorausgesagt haben und von Wu and Crothers (1984), die gezeigt haben, daß die Sequenz $5'C(A)_5-6T3'$ der K-DNA für einen sogenannten "Bend", d.h. einen Knick in der DNA verantwortlich ist. Ryder et al. (1986) konnten zeigen, daß die DNA von pONwt eine veränderte Konformation aufweist. Diese ist wahrscheinlich auf einen "Bend" in der Spacer Region zurückzuführen; mutierte Spacer, wie in pONsubSPA, bei denen die $(A)_6$ nicht erhalten sind, zeigen dagegen keine Besonderheit in der Struktur. Auffallend ist dabei, daß diese "bent"-Form ebenfalls vom Protein-DNA Komplex beibehalten wird.

Aus den bisher erwähnten Untersuchungen und einer STEM-Messung an pONwt (Ryder et al., 1985) und ähnlichen Experimenten von Mastrangelo et al. (1985), die gezeigt haben, daß pro Erkennungspentanukleotid ein T-Antigen Monomer bindet, kann hier ein Modell für die Bindung des T-Antigens an Bindungsstelle I erstellt werden. Diese Bindungsstelle besteht, wie erwähnt, aus drei Komponenten: den zwei Pentameren und dem Spacer. Ein T-Antigen Monomer erkennt ein Pentanukleotid und bindet

daran. Erst durch die Interaktion mit einem anderen Monomer, das an den zweiten Pentanukleotid bindet, wird die Bindung stabilisiert. Diese Wechselwirkungen kommen mit Hilfe der "bent" Form des Spacers zustande. Man kann genauso von einem schon geformten Dimer ausgehen, dessen Bindung ebenfalls durch die besondere Konformation der Bindungsstelle ermöglicht wird. Dies ist ein erster Hinweis, daß bei Protein-DNA Interaktionen nicht nur die Sequenzspezifität eine Rolle spielt, sondern auch die Konformation der DNA. Weiterhin können zwei der Komponenten allein die Bindung von T-Antigen Monomeren oder Dimeren auf Bindungsstelle I dirigieren. Dies haben die Footprint-Experimente auf der mutierten Bindungsstelle I bestätigt, wobei trotz der Veränderungen in einem der drei Komponenten der ganze Bereich geschützt wurde.

Mit dem Nachweis für die besondere Rolle der Spacer-Sequenz kann auch das Bindungsverhalten des SV40-T-Antigens an die BK- und JC- DNA, sowie an pONdlSPAA, erklärt werden. Hier sind noch die Untersuchungen von Koo, Wu and Crothers (1986) zu erwähnen, die gezeigt haben, daß das wiederholte Vorkommen von $(A)_n$ -Sequenzen, die mindestens 4bp lang sind, zum "bending" der DNA führt. Wenn hier für die Bindungsstelle I ein "Bend" der DNA bei den sechs Adenin-Resten des Spacers angenommen wird, würde man auch erwarten, daß diese besondere Konfiguration der DNA bis zu einer Verminderung von vier Adenin-Reste toleriert wird. In diesen Rahmen würden die schon beschriebenen Sequenzen der Bindungsstellen von BK $-(A)_5GA-$ und JC $-(A)_5TC$, sowie die Sequenz mit $(A)_5C$ von pONdlSPAA passen. Die unterschiedliche Affinität von BK- und JC-DNA könnte durch die restlichen Nukleotide des Spacers erklärt werden, die die "bent" Struktur in irgendeiner Weise beeinflussen können. Dagegen werden die Bedingungen bei pONdlSPA und LPV mit $(A)_3C$ nicht erfüllt. Daß man bei LPV doch eine T-Antigen Bindung nachweisen kann, muß eher an den

benachbarten Sequenzen liegen. Auffallend ist dabei, daß an dem einen Ende der Bindungsstelle eine (A)₄ und eine (A)₅ Sequenz anschließen, während an der anderen Seite der Bindungsstelle (A)₃, (A)₂, (T)₃ und (T)₂ Sequenzen liegen. Der Mechanismus, wie diese Sequenzen die Bindung beeinflussen können, ist noch nicht geklärt, aber das Vorhandensein solcher Sequenzen weist auf eine besondere Konformation der DNA um die Bindungsstelle und auch auf die Rolle der benachbarten Sequenzen hin.

Der Mechanismus der Bindung des T-Antigens an Bindungsstelle I, wie er hier vorgestellt wurde, beschreibt die Voraussetzungen für eine hoch affine Bindung des Proteins. Dies ist aber nicht die einzige Art der Interaktion des T-Antigens mit der DNA, was auch die unterschiedliche Struktur der Bindungsstelle II, sowie die in den Ergebnissen beschriebene Bindung an wiederholte Erkennungs-Sequenzen, wie sie bei den mehrfach synthetischen Kopien und den Polyoma-Sequenzen vorkommen, gezeigt haben. Es ist schwierig, für diese schwächere Bindung des Proteins an die DNA ein Modell für den Mechanismus zu entwickeln, da offensichtlich jeweils andere Faktoren dabei eine Rolle spielen.

Das wiederholte Vorkommen von 5'-G(A/G)GGC-3' in allen diesen Bindungsstellen bedeutet, daß mehrere T-Antigen Monomere jeweils mit schwacher Affinität pro Pentanukleotid binden würden. Sind sie daran gebunden, könnte sich ihre Bindung dadurch stabilisieren, daß Protein-Protein Wechselwirkungen zustande kommen. Voraussetzung dafür ist, daß die Lage der Erkennungssequenzen bzw. die Konfiguration der DNA für solche Interaktionen günstig ist.

Solche günstigen Bedingungen wären z.B. bei pONsubPEN 2 durch das Vorhandensein zweier "Bends", bedingt durch die doppelt vorliegende (A)₆C Sequenz, gegeben.

Bei pONdlSPA 3 ist es schwieriger, den Mechanismus zu

erklären. Das Vorkommen von sechs intakten GAGGC-Sequenzen ist vergleichbar mit den XhoI-Linker Oligomeren. Bei beiden DNAs scheint die Konfiguration der DNA nicht den relevanten Anteil bei der Bindung zu haben, sondern eher die hohe Anzahl der Erkennungssequenzen.

Bei der Polyoma DNA wiederum kommen in den Bindungsstellen A und C drei bis vier Pentamere vor, die wegen ihres 5-6bp Abstands auf der gleichen Seite der DNA angeordnet sind. Eine solche Anordnung würde ebenfalls Protein-Protein Interaktionen begünstigen.

Am ORI-Bereich von Polyoma kann ebenfalls eine Bindung festgestellt werden, die wegen der Anordnung der Pentamere wahrscheinlich nach einem ähnlichen Prinzip wie auf SV40 Bindungsstelle II erfolgt (DeLucia et al., 1983).

Schließlich haben die Bindungsexperimente mit Polyoma-DNA gezeigt, daß das Vorhandensein von zwei Bindungsstellen die Affinität erhöht. Dies würde mit früheren Untersuchungen an SV40-DNA übereinstimmen, die gezeigt haben, daß eine Bindung an schwachen Bindungsstellen für das T-Antigen, wie z.B. an die Bindungsstelle III, überhaupt erst durch das Vorhandensein von anderen Bindungsstellen feststellbar wird.

Eine andere Frage, die in meiner Arbeit gestellt wurde, war die nach der Form des Proteins, das an die DNA bindet. Die früheren DNA-Schutz-Experimente von Tegtmeyer et al. (1983) für verschiedene Fragmente aus den Bindungsstellen von T-Antigen, sowie die schon erwähnten STEM-Messungen von Mastrangelo et al. (1985) haben gezeigt, daß pro Pentanukleotid ein Protomer bindet. Ob bei der Bindung ein Monomer oder ein schon geformtes Dimer beteiligt ist, konnte bisher nicht bestimmt werden. Die Teilnahme eines Tetramers kann aus mehreren Gründen ausgeschlossen werden: Die STEM-Messung konnte bei Bindungsstelle I keine Tetramere feststellen.

Weiterhin wären die Ansprüche für eine korrekte Anordnung des Proteins z.B. an den nah benachbarten Pentameren der Bindungsstelle II für ein vorgeformtes Tetramer, dessen Untereinheiten wahrscheinlich nicht mehr so flexibel sind, zu hoch. Die Untersuchungen von Lewton et al. (1984) haben außerdem gezeigt, daß die verschiedenen Pentamere dabei in unterschiedlicher Stärke beteiligt sind, und daß sich das T-Antigen bei einzelnen Deletionen rasch an die veränderte Sequenz anpaßt.

Ein weiterer noch wichtigerer Grund sind die Bindungsexperimente mit einzelnen Subklassen des T-Antigens (R.Runzler, pers. Mitteilung), die gezeigt haben, daß bei gleicher Konzentration des Proteins die Tetramer Form eine sehr geringe Bindungsaktivität, besonders für die Bindungsstelle II allein, aufweist.

Um die Stöchiometrie der gebundene Moleküle an den Bindungsstellen zu untersuchen, wurde das Verhalten von Protein-DNA Komplexen im Gel Retention Assay untersucht. Dadurch wurde bestätigt, daß die hauptsächlich vorkommenden Protein-DNA Komplexe mit Extrakten transformierter COSI-Zellen, sowie mit einzelnen Fraktionen der Subklassen, solche mit Dimeren Formen des T-Antigens sind. Daneben sind auch Monomer-DNA Komplexe gefunden worden, jedoch keine Tetramer-Komplexe.

Dagegen hat man selbst mit T-Antigen aus der I4S-Fraktion Dimer-Komplexe mit der Bindungsstelle I beobachtet. Daraus könnte man schließen, daß das Tetramer als solches nicht aktiv an der Bindung beteiligt ist, und die Bindungsaktivität, die wir feststellen, durch dissoziierte Oligomere oder verunreinigte I4S-Fractionen verursacht wird. Die Annahme, daß das Tetramer dissoziiert, ist durch Untersuchungen von Baumann and Hand (1982), Montenarh and Henning (1983), Scheidtmann et al. (1984); sowie R.Runzler (pers. Mitteilung) bestätigt worden. Sie konnten zeigen, daß sowohl Chelat-bildende Moleküle, wie EDTA, als auch die

Dephosphorylierung des Tetramers zu seiner Dissoziation führen. Daß man in der 14S-Fraktion trotz dissoziierter Tetramere gar keine Bindung feststellen konnte, liegt wahrscheinlich an einer für die Bindung noch inaktiven Form solcher Mono- oder Dimere.

Durch diese Annahmen können nun ebenfalls die Footprint-Experimente erklärt werden, die gezeigt haben, daß alle Formen des Proteins auf der DNA das gleiche Schutzmuster hervorrufen. Monomere aus der 5S-Fraktion und Mono- oder Dimer- Formen sowohl aus der 7S- als auch aus der 14S-Fraktion ordnen sich auf der DNA in gleicher Weise an. So kann man daraus schließen, daß die bei der Bindung aktiven Formen Mono- bzw. Dimer Moleküle sind, und daß ihre Anordnung auf der DNA entsprechend der Anzahl und Orientierung von Erkennungssequenzen erfolgt.

Durch den modifizierten Footprint-Test konnten eine Reihe von mutierten T-Antigenen auf ihre Anordnung auf der DNA getestet werden. Da bekannt ist, daß u.a. die Bindung des T-Antigens an die DNA und insbesondere an die Bindungsstelle II bei der Regulation der Replikation von Bedeutung ist, würde man bei replikations-defekten Mutanten Unterschiede zum Bindungsverhalten des Wildtyps erwarten.

Es zeigte sich aber, daß sich alle diese Mutanten T-Antigene (VLM, MSA, THK-1t) -mit Ausnahme von H65/90B T-Antigen- auf der DNA ähnlich wie das Wildtyp COS1-T-Antigen anordneten, und daß auch sonst ihr Bindungsverhalten vergleichbar war. Das H65/90B T-Antigen dagegen hat an die Bindungsstelle II mit stark verminderter Aktivität gebunden. Dieser Effekt war auch bei der für die Bindungsstelle II günstigeren Bedingungen bei 37°C vorhanden, wenn auch weniger signifikant.

Das Bindungsverhalten dieses mutierten T-Antigens bietet

einen weiteren Hinweis für den unterschiedlichen Mechanismus der Interaktion des Proteins mit Bindungsstelle I und Bindungsstelle II. Man kann daher annehmen, daß bei der Stabilisierung der Bindung des T-Antigens an verschiedenen Bindungsstellen auch unterschiedliche Protein-Protein Interaktionen möglich sind oder, daß verschiedene Formen des Proteins beteiligt sind. So könnten Mutationen, wie bei dem H65/90B-T-Antigen, solche Wechselwirkungen oder Änderungen des Proteins an der Bindungsstelle I tolerieren, während bei der Bindungsstelle II, die Bindung dadurch verhindert wird.

Schließlich soll hier noch auf eine weitere Funktion der T-Antigen Bindung eingegangen werden.

Die in dieser Arbeit angewandten Bindungsmethoden haben auch die Untersuchung der ATP-Inhibition der Bindung ermöglicht. Wie von Vogt et al. (1986) beschrieben, konnte detailliert nachgewiesen werden, daß ATP und andere Purinnukleosidtriphosphate die Bindung inhibieren. Daraus läßt sich vermuten, daß das T-Antigen in zwei Formen vorkommt: in einer für die Bindung aktiven und einer dafür inaktiven Form. Dies bedeutet, daß man z.B. in den verschiedenen Subklassen-Fractionen ein Gemisch aus unterschiedlichen Formen des Proteins erhält. Ob diese verschiedenen Formen den schon beschriebenen aktiven und inaktiven Formen bei der Dissoziation von Oligomeren entsprechen, ist noch nicht geklärt.

Aus den beschriebenen Untersuchungen wird ersichtlich, daß die Ableitung eines allgemein gültigen Modells für die Bindung des T-Antigens an DNA Sequenzen nur unter Vorbehalten zu erstellen ist. Dabei müssen eine Reihe von Faktoren berücksichtigt werden, deren Zusammenfassung mehrere Möglichkeiten der Interpretation erlauben. Die geforderten Voraussetzungen beschränken sich nicht nur auf

das Vorhandensein spezifischer Sequenzen. Zu berücksichtigen sind vielmehr auch die Anordnung und Anzahl dieser Erkennungssequenzen, sowie die Konformation der DNA an der Bindungsstelle. Nicht zuletzt weist auch die Vielfalt der unterschiedlichen Formen des beteiligten T-Antigens auf die Komplexität der Interaktionen hin.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die strukturellen und funktionellen Voraussetzungen für die Wechselwirkungen des SV40-T-Antigens mit der viralen DNA untersucht.

Durch eine detaillierte Mutationsanalyse der Bindungsstelle I, sowie durch den Vergleich mit verwandten Sequenzen wurden die geforderten Bedingungen für eine hoch affine Bindungsstelle des SV40-T-Antigens auf der DNA abgeleitet. Dabei zeigte sich für Bindungsstelle I, daß die Anzahl und Orientierung der Erkennungssequenzen, die Länge und Sequenz des dazwischen liegenden Spacers und die flankierenden Sequenzen für die Bindung entscheidend sind.

Für die Interaktion des SV40-T-Antigens mit der viralen DNA wurde weiterhin gezeigt, daß der Bindungsmechanismus für die verschiedenen Bindungsstellen unterschiedlich ist und dabei nicht nur die Sequenzspezifität sondern auch die Konformation der DNA für Wechselwirkungen zwischen Proteinuntereinheiten und die Stabilisierung der Bindung wichtig sind.

Schließlich wurde nachgewiesen, daß die bei der Bindung aktive Form des Proteins Mono- oder Dimer Moleküle sind, und daß Tetramere als solche nicht binden können. Es kann außerdem angenommen werden, daß unterschiedliche Formen des T-Antigens existieren, die sich in ihrem Bindungsverhalten unterscheiden und damit die biologischen Funktionen des Proteins beeinflussen.

VII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Arnott, S., Chandrasekaran, R., Hall, I.H., and Puigjaner, L.C. (1983).
Heteronomous DNA. *Nucl. Acids Res.* 11 , 4141-4155.
- Baty, D., Barrera-Saldana, H.A., Everett, R.D., Vigneron, M., Chambon, P. (1984)
Mutational dissection of the 21bp repeat region of the SV40 early promoter reveals that it contains overlapping elements of the early-early and late-early promoters. *Nucl. Acids Res.* 12 , 915-932.
- Baumann, E.A., and Hand, R. (1982).
Phosphorylation and dephosphorylation alter the structure of D2 hybrid T-Antigen. *J. Virol.* 44 , 78-87.
- Baumgartner, J., Kuhn, C., Fanning, E. (1979).
Identification and characterization of fast-sedimenting SV40 nucleoprotein complexes. *Virology* 96 , 54-63.
- Black, P.H., and Rowe, W.P. (1963).
An analysis of SV40-induced transformation of hamster kidney tissue in vitro. I. General characteristics. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 50 , 606-613.
- Boyer, H.W., and Roulland-Dussoix, D. (1969).
A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41 , 459-472.
- Burger, C., and Fanning, E. (1983).

Specific DNA binding activity of T antigen subclasses varies among different SV40-transformed cell lines. Virology 126 , 19-31.

Chen, E.J., and Seeburg, P.H. (1985).

Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. DNA 4 , 165-170.

Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., and Hsu, L. (1972).

Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of E.coli by R-factor DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 , 2110-2114.

Cowie, A., and Kamen, R. (1984).

Multiple binding sites for polyomavirus large T-Antigen within regulatory sequences of polyomavirus DNA. J. Virol. 52 , 750-760.

Defendi, V., and Jensen, F. (1967).

Oncogenicity by DNA tumor viruses: Enhancement after ultraviolet and cobalt 60 radiations. Science 157 , 703-705.

DeLucia, A.L., Lewton, B.A., Tjian, R., and Tegtmeyer, P. (1983).

Topography of simian virus 40 A protein-DNA complexes: arrangement of pentanucleotide interaction sites at the origin of replication. J. Virol. 46 , 143-150.

Dente, L., Cesarini, G., Cortese, R. (1983).

pEMBL: a new family of single-stranded plasmids. Nucl. Acids Res. 11 , 1645-1655.

DiMaio, D., and Nathans, D. (1980).

Cold-sensitive regulatory mutants of simian virus 40.

J. Mol. Biol. 140 , 129-142.

DiMaio, D. and Nathans, D. (1982).

Regulatory mutants of simian virus 40. Effect of mutations at a T antigen binding site in DNA replication and expression of viral genes. J. Mol. Biol. 156 , 531-548.

Dixon, R.A.F., and Nathans, D. (1985).

Purification of simian virus large T antigen by immunoaffinity chromatography. J. Virol. 53 , 1001-1004.

Dubbs, D.R., Kit, S., De Torres, R.A., and Anken, M. (1967).

Virogenic properties of bromodeoxyuridine-sensitive and bromodeoxyuridine-resistant simian virus 40-transformed mouse kidney cells. J. Virol. 1 , 968-979.

Dulbecco, R., and Freeman, G. (1959).

Plaque production by the polyoma virus. Virology 8 , 396-397.

Dorn, A., Brauer, D., Fanning, E., and Knippers, R. (1982).

Subclasses of simian virus 40 large tumor antigen: Partial purification and DNA binding properties of two subclasses of tumor antigen from productively infected cells. Eur. J. Biochem. 128 , 53-62.

Ey, P.L., Prowse, S.J., and Jenkin, C.R. (1978).

Isolation of pure IgG 1, IgG 2a and IgG 2b immunoglobulins from mouse serum using Protein A-Sepharose. Immunochemistry 15 , 429-436.

Fanning, E., Westphal, K.-H., Brauer, D., and Cörlin, D.

(1982).

Subclasses of simian virus 40 large T antigen: Differential binding of two subclasses of T antigen from productively infected cells to viral and cellular DNA. EMBO J. 1 , 1023-1028.

Fried, M., and Crothers, D.M. (1981).

Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. Nucl. Acids Res. 9 , 6505-6525.

Frisque, R.J. (1983).

Nucleotide sequence of the region encompassing the JC virus origin of DNA replication. J. Virol. 46 , 170-176.

Galas, D.J., and Schmitz, A. (1978).

DNAase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA specificity. Nucl. Acids Res. 5 , 3157-3170.

Gergen, J.P., Stern, R.H., and Wensink, P.C. (1979).

Filter replicas and permanent collections of recombinant DNA plasmids. Nucl. Acids Res. 7 , 2115-2120.

Gluzman, Y. (1981).

SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. Cell 23 , 175-182.

Gurney, E.G., Tamowski, S., and Deppert, W. (1986).

Antigenic binding sites of monoclonal antibodies specific for simian virus 40 large T antigen. J. Virol. 57 , 1168-1172.

Hansen, U., Tenen, D., Livingston, D.M., and Sharp, P.A. (1981).

T antigen repression of SV40 early transcription from two promoters. *Cell* 27 , 603-612.

Huber, B., Vakalopoulou, E., Burger, C., Fanning, E. (1985).

Identification and biochemical analysis of DNA replication-defective large *T* antigens from SV40-transformed cells. *Virology* 146 , 188-202.

Itakura, K., Rossi, J.J., and Wallace, R.B. (1984).

Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Ann. Rev. Biochem.* 53 , 323-356.

Jones, K.A., and Tjian, R. (1984).

Essential contact residues within SV40 large *T* antigen binding sites I and II identified by alkylation interference. *Cell* 36 , 155-162.

Lewton, B.A., DeLucia, A.L., Tegtmeyer, P. (1984).

Binding of simian virus 40 A protein to DNA with deletions at the origin of replication. *J. Virol.* 49 , 9-13.

Katinka, M., Yaniv, M., Vasseur, M., Brangg, D. (1980)

Expression of polyoma early functions in mouse embryonal carcinoma cells depends upon sequence rearrangements in the beginning of the late region. *Cell* 20 , 393-399.

Kessler, S.W. (1975).

Rapid isolation of antigens from cells with a *Staphylococcal* protein A-antibody absorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with

protein A. *J. Immunol.* 115 , 1617-1624.

Koo, H.-S., Wu, H.-M., and Crothers, D.M. (1986).

DNA bending at adenine-thymine tracts. *Nature* 320 , 501-506.

Levinson, A., Silver, D., and Seed, B. (1984).

Minimal size plasmids containing an M13 origin for production of single-strand transducing particles. *J. Mol. Appl. Gen.* 2 , 507-517.

Lewton, B.A., DeLucia, A.L., and Tegtmeyer, P. (1984).

Binding of simian virus 40 A protein to DNA with deletions at the origin of replication. *J. Virol.* 49 , 9-13.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982).

Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Margolskee, R.F., and Nathans, D. (1984).

Simian virus 40 mutant T antigens with relaxed specificity for the nucleotide sequence at the viral DNA origin of replication. *J. Virol.* 49 , 386-393.

Mastrangelo, I.A., Hough, P.V.C., Wilson, V.G., Wall, J.S., Hainfeld, J.F., Tegtmeyer, P. (1985).

Monomers through trimers of large T antigen in region I and monomers through tetramers in region II bind to SV40 origin DNA as stable structures in solution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82 , 3626-3630.

McKay, R.D.G. (1981).

Binding of a simian virus 40 T antigen-related protein to DNA. *J. Mol. Biol.* 145 , 471-488.

Montenarh, M., and Henning, R. (1983).

Self-assembly of simian virus 40 large T antigen oligomers by divalent cations. *J. Virol.* 45, 531-538.

Myers, R., and Tjian, R. (1980).

Construction and analysis of SV40 origins defective in T antigen binding and DNA replication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77, 6491-6495.

Pawlita, M., Clad A., and zur Hausen, H. (1985).

Complete DNA sequence of Lymphotropic Papovavirus: Prototype of a new species of the Polyomavirus genus. *Virology* 143, 196-211.

Pomerantz, B.J., and Hassell, J.A. (1984).

Polyoma and simian virus 40 large T antigens bind to common DNA sequences. *J. Virol.* 49, 925-937.

Reed, S.I., Ferguson, J., Davis, R.W., Stark, G.R. (1975).

T antigen binds to simian virus 40 DNA at the origin of replication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 1605-1609.

Rigby, P.W.J., and Lane, D.P. (1983).

The structure and function of SV40 large T antigen. *Adv. Viral Oncology* 3, 31-57. G. Klein, ed., Raven Press, New York.

Rio, D., Robbins, A., Myers, R., Tjian, R. (1980).

Regulation of simian virus 40 early transcription in vitro by a purified tumor antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77, 5706-5710.

Robb, J.A., and Huebner, K. (1973).

Effect of cell chromosome number on simian virus 40

replication. *Exp. Cell. Res.* 81 , 120-126.

Ryder, K., Vakalopoulou, E., Mertz, R., Mastrangelo, I.,
Hough, P., Tegtmeier, P., Fanning, E. (1985).
Seventeen base pairs of region I encode a novel
tripartite binding signal for SV40 T antigen. *Cell* 42
, 539-548.

Scheidtmann, K.-H., Hardung, M., Echle, B., and Walter, G.
(1984).
DNA binding activity of simian virus 40 large T antigen
correlates with a distinct phosphorylation state. *J.*
Virol. 50 , 1-12.

Seif, I., Khoury, G., Dhar, R. (1979).
The genome of human papovavirus BKV. *Cell* 18 ,
963-977.

Shalloway, D., Kleinberger, T., and Livingston, D.M. (1980).
Mapping of SV40 replication origin region binding sites
for the SV40 T antigen by protection against
exonuclease III digestion. *Cell* 20 , 411-422.

Shortle, D.R., Margolskee, R.F., and Nathans, D. (1979).
Mutational analysis of a simian virus 40 replicon:
Pseudorevertants of mutants with a defective
replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 ,
6128-6131.

Smith, A.E., Smith, R., and Paucha, E. (1978).
Extraction and fingerprint analysis of simian virus 40
large and small T antigen. *J. Virol.* 28 , 140-153.

Sperka S. (1983).
Chemische Synthese und Klonierung eines

Oligonukleotids, das als SV40 T-Antigen Bindungsstelle erkannt wird.

Diplomarbeit, Institut für Biochemie der Universität München.

Sutcliffe, J.G. (1978).

Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43 , 43-77.

Takemoto, K.H., Kirschstein, R.L., and Habel, K. (1966).

Mutants of simian virus 40 differing in plaque sizes, oncogenicity and heat sensibility. J. Bacteriol. 92 , 990-994.

Tegtmeyer, P., and Andersen, B. (1981).

Partial purification of SV40 A protein and a related cellular protein from permissive cells. Virology 115 , 67-74.

Tegtmeyer, P., Andersen, B., Shaw, S.B., and Wilson, V.G. (1981).

Alternative interactions of the SV40 A protein with DNA. Virology 115 , 75-87.

Tegtmeyer, P., Lewton, B.A., DeLucia, A.L., Wilson, V.G., Ryder, K. (1983).

Topography of simian virus 40 A protein-DNA complexes: arrangement of protein bound to the origin of replication. J. Virol. 46 , 151-161.

Thompson, S.L. (1984).

Specific DNA binding and oligomerization of simian virus 40 large T antigen.

Diplomarbeit, Institut für Biochemie der Universität

München.

Tjian, R. (1978).

Protein-DNA interactions at the origin of simian virus 40 DNA replication. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43 , 655-662.

Tjian, R. (1978).

The binding site on SV40 DNA for a T antigen-related protein. Cell 13 , 165-179.

Tooze, J. (1981).

Molecular Biology of Tumor Virus: Part 2, DNA Tumor Viruses, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Twigg, A., and Sherratt, D. (1980).

Trans-complementable copy number mutants of plasmid ColE1. Nature 283 , 216-218.

Vogt, B., Vakalopoulou, E., and Fanning, E. (1986).

Allosteric control of simian virus 40 T antigen binding to viral origin DNA. J. Virol. 58 , 000-000.

Vinograd, J., Morris, J., Davidson, N., Dove, W.F.jr. (1963).

The buoyant behavior of viral and bacterial DNA in alkaline CsCl. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 49 , 12-17.

Wallace, R.B., Johnson, M.J., Suggs, S.Y., Miyoski, K., Bhatt, R., Itakura, K. (1981).

A set of synthetic primers for DNA sequencing in the plasmid pBR322. Gene 16 , 21-26.

Winberg, G., and Hammar skjöld, M.L. (1980).

Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper. Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA. Nucl. Acids Res. 8 , 253-264.

Wu, H., and Crothers, D.M. (1984).

The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. Nature 308 , 509-513.

Zarling, J.M., and Tevethia, S.S. (1973).

Transplantation immunity of simian virus 40-transformed cells in tumor-bearing mice. I. Development of cellular immunity to simian virus 40 tumor-specific transplantation antigens during tumorigenesis by transplanted cells. J. Natl. Cancer Inst. 50 , 137-147.

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1983 bis Februar 1986 auf Anregung und unter Anleitung von Frau Prof. Dr. E. Fanning-Honegger am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität, München ausgeführt. Ihr danke ich für die Ratschläge und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Ronald Mertz und Frau Sabine Stelzig danke ich für die Synthese der Oligonukleotide.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Ursula Markau und Frau Andrea Schmid für ihre experimentelle Hilfe und die Herstellung der Photographien.

Weiterhin danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen, die meine Arbeit unterstützt haben; besonders Inge, Brigitte und den Sabinen.

Abschließend danke ich der Konrad-Adenauer-Stiftung, die mir durch die Gewährung eines Promotionsstipendiums die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat. Herr Julius Becker hat mich besonders durch seine Freundlichkeit ermutigt.

L E B E N S L A U F

- 8.9.1958 *geboren in Piräus - Griechenland - als Tochter des Kapitäns der Handelsmarine, Dimitrios Vakalopoulos, und seiner Ehefrau, Xanthi Vakalopoulou*
- 1964-1970 *Besuch der Volksschule in Paleon-Phaliron, Athen*
- 1970-1976 *Besuch der Deutschen Schule in Athen*
- Juli 1976 *Abitur an der Deutschen Schule in Athen*
- Sept. 1976 *Immatrikulation zum WS an der Universität Freiburg i. Br. im Fach Biologie*
- April 1979 *Vordiplomprüfung im Fach Biologie*
- August 1981 *Diplomprüfung im Fach Biologie
Hauptfach: Mikrobiologie;
Nebenfächer: Biochemie, Zellbiologie, Archäologie*
- Okt. 1981- *Diplomarbeit über "Die Isolierung und*
- Juni 1982 *Charakterisierung von Membranen von Azotobacter vinelandii" an dem Institut für Mikrobiologie der Universität Freiburg, unter der Leitung von Prof.Dr.J.Oelze*
- Jan. 1983- *Doktorarbeit über "Strukturelle und*
- Feb. 1986 *funktionelle Voraussetzungen für die sequenzspezifische Bindung des SV40 T-Antigens an das virale Genom" an dem Institut für Biochemie der Universität München, unter der Leitung von Prof.Dr.E.Fanning*

